

**Effekte von Nanosekunden gepulsten elektrischen Feldern
auf Zellen im Monolayer**

Dissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität Rostock

vorgelegt von

Anna Steuer

aus Greifswald

Rostock, den 26.01.2016

1. Gutachter: Prof. Dr. Juergen F. Kolb

INP Greifswald / Institut für Physik, Universität Rostock

2. Gutachter: Prof. Dr. Georg Müller

Karlsruher Institut für Technologie (KIT)

Tag der Verteidigung: 08.06.2016

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	IV
1 Einleitung.....	1
1.1 Gepulste elektrische Felder und ihre biologischen Anwendungen	1
1.1.1 Historische Entwicklung und Parameterbereiche	1
1.1.2 Elektrische Eigenschaften von Zellmembranen und ihr Verhalten in elektrischen Feldern	3
1.1.3 Biologische Effekte von Nanosekunden gepulsten elektrischen Feldern.....	8
1.2 Zell-Zell-Kommunikation über Gap Junctions	9
1.2.1 Aufbau, Eigenschaften und Funktionen von Gap Junctions.....	9
1.2.2 Lebenszyklus und Regulation der Gap Junctions	11
1.2.3 Zell-Zell-Kommunikation, Connexine und Krankheiten	13
1.3 Zusammenhang von Zellelastizität, Malignität und Invasivität	15
1.4 Zielstellung.....	17
2 Material und Methoden.....	20
2.1 Zellkultur.....	20
2.2 Erzeugung von Nanosekunden gepulsten elektrischen Feldern	21
2.3 Behandlung von Zellen mit nsPEFs	22
2.4 Bestimmung der Zellvitalität.....	23
2.5 Nachweis von Elektroporation.....	24
2.6 Nachweis der Zell-Zell-Kommunikation mittels Fluoreszenzfarbstoff-Transfer As- say.....	24
2.7 Nachweis von Cx43, F-Aktin und ZO-1 mittels Immunfluoreszenz	25
2.8 Analyse der Genexpression.....	26
2.8.1 Isolierung der RNA.....	26
2.8.2 Transkription der cDNA	27
2.8.3 Quantitative Real-Time Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)	27
2.9 Proteinanalyse	28
2.9.1 Bestimmung der Proteinkonzentrationen	28
2.9.2 Western Blot	28

Inhaltsverzeichnis

2.10 Statistik.....	29
2.11 Rasterkraftmikroskopie	29
2.11.1 Aufbau und Funktionsweise	29
2.11.2 Kraft-Abstand-Kurven und Bestimmung der Elastizitätsmoduln.....	31
2.12 Scratch Assay	34
2.13 Soft Agar Colony Formation Assay	35
 3 Ergebnisse	 36
3.1 Erzeugung eines 100 ns-Pulses	36
3.2 Simulation der elektrischen Feldstärkeverteilung	37
3.3 Zellvitalität und Elektroporation	38
3.4 Effekte von nsPEFs auf die Zell-Zell-Kommunikation	41
3.4.1 Effekte auf die Zell-Zell-Kommunikation von WB-F344	42
3.4.2 Änderung der Zell-Zell-Kommunikation in Abhängigkeit von der Feld- stärke	44
3.4.3 Effekte auf die Zell-Zell-Kommunikation von WB-ras	46
3.4.4 Vergleich von Behandlungen der Zellen mit 20 und 100 Pulsen	47
3.5 Immunfluoreszenzfärbungen von Cx43, F-Aktin und ZO-1	48
3.6 Analyse der Cx43-Genexpression	51
3.7 Analyse der MAP-Kinase-Aktivierung und der Proteinexpression von Cx43	53
3.7.1 Erk1/2	53
3.7.2 p38	55
3.7.3 Cx43.....	55
3.8 Effekte von nsPEFs auf die Elastizität von Zellen	57
3.8.1 Zeitliche Entwicklung der Elastizitätsmoduln	59
3.8.2 Vergleich der Elastizität über dem Zellkern und dem Zellrand	64
3.8.3 Zusammenhang von Elastizität und Zytoskelett.....	66
3.9 Einfluss von nsPEF auf Kanzerogenese und Invasivität von Zellen.....	67
3.9.1 Migration und Proliferation	68
3.9.2 Maligne Transformation	70
 4 Diskussion.....	 71
4.1 Vergleich idealer und realer Hochspannungspuls	71
4.2 Zellvitalität	72

4.3 Zell-Zell-Kommunikation	74
4.3.1 Verteilung von Cx43 in den Zellen	75
4.3.2 Gen- und Proteinexpression von Cx43	76
4.3.3 Direkte Effekte von nsPEFs auf die Zell-Zell-Kommunikation.....	78
4.3.4 Indirekte Effekte von nsPEFs auf die Zell-Zell-Kommunikation	79
4.4 Zellelastizität, Transformation und Metastasierungspotential	82
4.5 Bedeutung für medizinische Anwendungsmöglichkeiten.....	86
 5. Zusammenfassung.....	 88
 6. Literaturverzeichnis	 91

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AFM	Ratserkraftmikroskopie (engl. <i>atomic force microscopy</i>)
BSA	Rinder-Serum-Albumin
bzw.	beziehungsweise
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CK1	Casein-Kinase 1
Cl ⁻	Chlorid
CO ₂	Kohlendioxid
Cx43	Connexin43
Da	Dalton
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
d.h.	das heißt
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
dNTP's	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Salt Solution
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EP	Elektroporation
ER	Endoplasmatisches Retikulum
Erk1/2	extracellular signal regulated kinases
FCS	fötales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FWHM	Halbwertsbreite (engl. <i>full width at half maximum</i>)
GJ	Gap Junction
GTP	Guanosin Triphosphat
h	Stunde
HBSS	Hank's balanced salt solution
HRP	Meerrettichperoxidase (engl. <i>horseradish peroxidase</i>)
K ⁺	Kalium
Ktrl.	Kontrolle
LY	Lucifer Yellow
MAP-Kinase	mitogen-aktivierte Proteinkinase
MEM	Minimum Essential Medium
µs	Mikrosekunden

min	Minute
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
Na ⁺	Natrium
NADP	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
ns	Nanosekunden
nsPEF	Nanosekunden gepulste elektrische Felder (engl. <i>nanosecond pulsed electric field</i>)
PBS	Phosphate buffered saline
PDGF	platelet-derived growth factor
PFA	Paraformaldehyd
PI	Propidiumiodid
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qPCR	Quantitative Real-Time Polymerasekettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
RNasin	Ribonuklease Inhibitor
RPL13A	60S ribosomal protein L13a
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl. <i>rounds per minute</i>)
s.	siehe
SD	Standardabweichung (engl. <i>standard deviation</i>)
SDS	Natriumdodecylsulfat
TGN	<i>trans</i> -Golgi-Netzwerk
TPA	12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate
TR	Texas Red
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TBST	<i>Gemisch aus Tris und Tween 20</i>
U/ml	Einheiten (engl. <i>units</i>) pro Milliliter
unbeh.	unbehandelt
UV	Ultraviolett
YM	Youngscher Modul
z.B.	zum Beispiel
ZO-1	Zonula Occludens 1
ZZK	Zell-Zell-Kommunikation

1 Einleitung

1.1 Gepulste elektrische Felder und ihre biologischen Anwendungen

1.1.1 Historische Entwicklung und Parameterbereiche

Die Effekte von elektrischen Feldern auf biologische Materie wurden bereits im 18. und 19. Jahrhundert beschrieben. 1754 berichtete J.A. Nollet erstmals von der Bildung roter Flecken auf der Haut von Tieren und Menschen, nachdem sie mit elektrischen Funken behandelt wurden [1]. Heute scheint es wahrscheinlich, dass diese Flecken nicht nur durch thermische Schäden, sondern auch durch die irreversible Bildung von Poren in der Zellmembran der Kapillaren aufgrund der transient einwirkenden elektrischen Felder verursacht wurden.

Im 20. Jahrhundert wurden die ersten systematischen Untersuchungen von gepulsten elektrischen Feldern an Nerven durchgeführt. B. Frankenhaeuser und L. Widén konstatierten 1956 die veränderte Leitfähigkeit von Nerven, nachdem sie diese mit Pulsen mit einer Dauer im Millisekunden-Bereich stimuliert hatten [2]. Diese Beobachtungen wurden kurze Zeit später durch Studien von R. Stämpfli bestätigt, der diese Effekte mit dem Zusammenbruch des Membranpotentials unter dem Einfluss der gepulsten elektrischen Felder erklärte. Zudem beschrieb er, dass die beobachteten Effekte unter bestimmten Umständen reversibel sein können [3]. 1972 wies E. Neumann zusammen mit K. Rosenheck die reversible Bildung von Poren in Zellmembranen nach, nachdem Zellen mit elektrischen Pulsen behandelt wurden [4]. Zehn Jahre später nutzte Neumann diesen Effekt zum Einbringen von Fremdgenen in Zellen und bezeichnete die Porenbildung in Zellmembranen aufgrund gepulster elektrischer Felder erstmals als *Elektroporation* [5].

Heute weiß man, dass mit der Wahl von Feldstärke und Pulslänge gezielt bestimmte Effekte ausgelöst werden können, wie in Abb. 1.1 dargestellt. Die strichpunktierte Linie zeigt, bei welcher Pulslänge welche Feldstärke nötig ist, um das kritische Transmembranpotential von ungefähr 1 V zu erreichen, ab dem sich Poren in der Zellmembran ausbilden, wobei der tatsächliche Schwellwert vom Zelltyp abhängt. Die gestrichelte Linie grenzt den Bereich ab, in dem biologische Effekte überwiegend auf thermische Effekte zurückzuführen sind (im Beispiel für einen durch die Pulse verursachten Temperaturanstieg von 10 K).

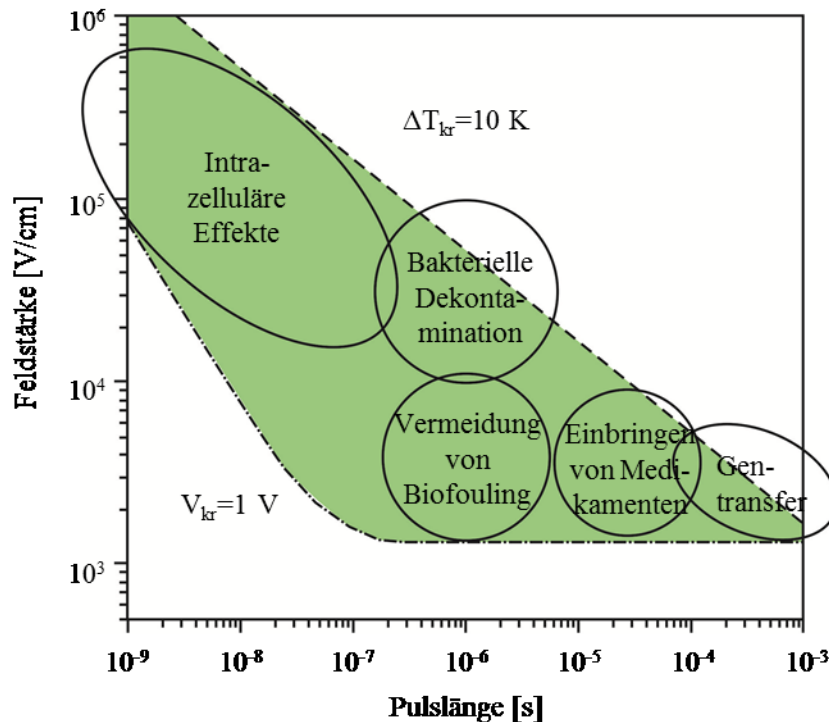


Abb. 1.1* Anwendungsmöglichkeiten von gepulsten elektrischen Feldern an Zellen und Geweben. Die strichpunktierte Linie zeigt an, welche Parameter zum Erreichen der kritischen Spannung V_{kr} nötig sind, um verschiedene Effekte hervorzurufen, wie z.B. Porenbildung in der Membran oder intrazelluläre Mechanismen. Die gestrichelte Linie gibt die Grenze an, ab der thermische Effekte beginnen eine dominante Rolle zu spielen. *nach [6]

Neben dem Einbringen von Fremd-Genen in eukaryotische Zellen mit dem Ziel der rekombinanten Expression in diesen Zellen [7, 8], werden Millisekunden gepulste elektrische Felder auch zur Behandlung von Tumoren angewendet. Die Elektrochemotherapie, deren Wirksamkeit und Effektivität bereits in mehreren klinischen Studien getestet wurde, macht sich das Prinzip der reversiblen Elektroporation zu Nutze [9]. Die in der Krebstherapie verwendeten Zytostatika sind Moleküle, die aufgrund ihrer Größe und Hydrophilie kaum membrangängig sind. Mit Hilfe der Elektroporation werden Poren erzeugt, durch die die Medikamente ins Zellinnere diffundieren können. Dadurch wird die Wirksamkeit der Chemotherapeutika trotz geringerer Dosierung um ein Vielfaches gesteigert und Nebenwirkungen werden gleichzeitig stark vermindert [10, 11].

Im Vergleich dazu können Pulse mit einer Länge im Bereich von Mikrosekunden zur bakteriellen Dekontamination von Lebensmitteln und Abwässern und zur Vermeidung von Biofouling angewendet werden [12-15].

Bei der Behandlung von Zellen mit Nanosekunden gepulsten elektrischen Feldern (engl. *nanosecond pulsed electric fields*; nsPEFs) wird im Unterschied zur Anwendung von längeren Pulsen eine vollständige Aufladung der äußeren Plasmamembran verhindert. Dadurch können nsPEFs die Zelle durchdringen und wirken sich hauptsächlich auf intrazelluläre Membranen aus [16, 17]. Die Wechselwirkung mit subzellulären Strukturen kann verschiedene Effekte innerhalb der Zelle hervorrufen, wie z.B. die Induktion der Apoptose oder die Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Speichern [6]. Die Effekte von Pulsen mit einer Dauer im Nanosekunden-Bereich auf Zellen sind auch Thema der vorliegenden Arbeit. Dabei lag der Fokus auf der Kommunikation zwischen Zellen, da diese über intrazelluläre Mechanismen, wie sie durch nsPEFs ausgelöst werden können, reguliert wird.

1.1.2 Elektrische Eigenschaften von Zellmembranen und ihr Verhalten in elektrischen Feldern

Sowohl im Inneren von Zellen als auch im Extrazellularraum befinden sich in unterschiedlichen Konzentrationen Ladungsträger wie Natrium (Na^+)-, Kalium (K^+)-, und Chlorid (Cl^-)-Ionen, die durch die Zellmembran voneinander getrennt sind. Die unterschiedlichen Ionenkonzentrationen und die damit verbundene ungleiche Verteilung der Ladungsträger auf beiden Seiten der Plasmamembran führen zu einem elektrochemischen Gradienten, der ein Potentialgefälle über der Plasmamembran bewirkt. Das resultierende Ruhepotential beträgt in Säugerzellen ca. -60 mV. Wird die Zellmembran um etwa 20 mV auf -40 mV depolarisiert und somit ein bestimmter Schwellenwert überschritten, öffnen sich spannungsgesteuerte Na^+ -Kanäle und im Fall von erregbaren Zellen wird ein Aktionspotential ausgelöst. Das Membranpotential verschiebt sich durch den Einstrom der Na^+ -Ionen zu einem Wert von ca. +40 mV, bevor die Membran schließlich wieder zu ihrem Ruhepotential zurückkehrt. Generell kann jede Membran depolarisiert werden, aber nur in erregbaren Zellen, wie Nerven- und Muskelzellen, wird ein Aktionspotential ausgelöst [18]. In nicht erregbaren Zellen, wie z.B. Astrocyten, Oligodendrocyten, Lymphocyten und Makrophagen, kehrt das Membranpotential ohne Aktionspotential zum Ruhewert zurück.

Im Gegensatz dazu können durch von außen angelegte elektrische Felder weit höhere Potentialunterschiede als die physiologischen Unterschiede von einigen mV erzeugt werden. Wird eine Zelle einem elektrischen Feld ausgesetzt, akkumulieren die Ionen entlang der Membran und führen so zu einem Anstieg des Membranpotentials. Ab einem Wert von ungefähr 1 V beginnen sich Poren in der Membran zu bilden [19, 20], es kommt zur Elek-

1 Einleitung

troporation (Abb. 1.2) [5]. Die Ladungsträger, die normalerweise durch die Membran voneinander getrennt sind, können nun durch diese hindurch diffundieren und die Transmembranspannung sinkt wieder. Je nach Wahl der Pulsparameter kann die Porenbildung reversibel oder irreversibel sein, d.h., dass sich entweder die Zellmembran regeneriert und sich die Poren wieder schließen oder aber die Zelle abstirbt [21, 22].

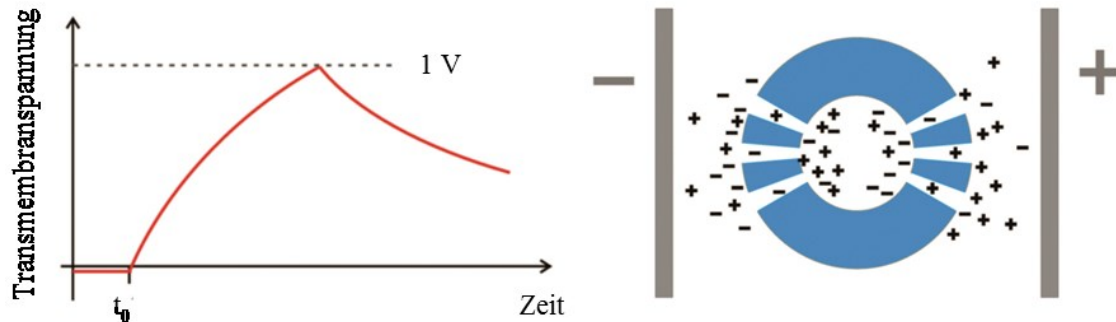


Abb. 1.2 Schematische Darstellung der Elektroporation: Wird eine Zelle einem elektrischen Feld ausgesetzt, akkumulieren die Ladungsträger entlang der Membran und die Transmembranspannung steigt an. Erreicht sie einen Wert von 1 V, bilden sich Poren in der Membran. Die Ladungsträger auf beiden Seiten der Zellmembran können diese nun passieren, wodurch die Transmembranspannung wieder sinkt.

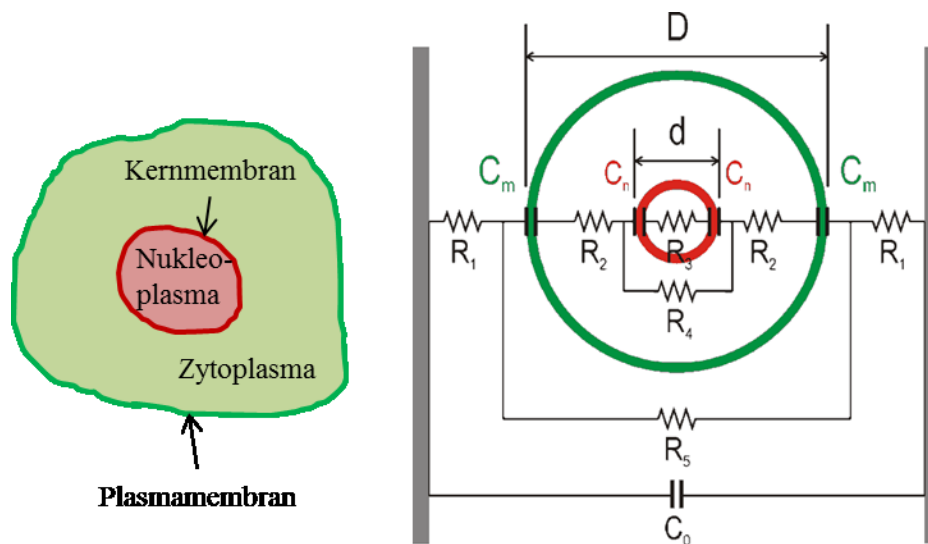


Abb. 1.3* Doppelschalenmodell einer Zelle und Ersatzschaltbild einer Zelle zwischen zwei Elektroden. Die Plasma- und Kernmembran werden mit den Kapazitäten C_m bzw. C_n beschrieben, das Zytoplasma bzw. Nukleoplasma durch die Widerstände R_2 , R_3 und R_4 . R_1 , R_5 und C_0 hängen von den elektrischen Eigenschaften des Mediums ab. *nach [17]

Vereinfacht kann die Membranaufladung auch in elektrischen Schaltbildern beschrieben werden. Dabei kann eine Zelle mit einer konzentrisch angeordneten Organelle (z.B. Nu-

kleus) als Kugelkondensator angesehen werden (Abb. 1.3). Das Zytoplasma sowie das Nukleoplasma sind mäßig leitfähig, die Membranen hingegen haben nur eine geringe Leitfähigkeit. Somit kann die Zelle als Leiter betrachtet werden, der von einer verlustbehafteten, isolierenden Hülle umgeben ist [17].

Unter diesen Annahmen kann die Änderung der Transmembranspannung der Plasmamembran in folgende Gleichung gefasst werden:

$$|\Delta V_m| = 1,5 \cdot E \cdot \frac{D}{2} \cdot (1 - e^{-\frac{t}{\tau_c}}) \quad (1.1)$$

dabei steht E für das elektrische Feld, D für den Durchmesser der Zelle und t für die Zeit, die die Zelle dem elektrischen Feld ausgesetzt ist. Die Ladezeitkonstante τ_c kann wiederum beschrieben werden durch:

$$\tau_c = (\rho_c + 0,5 \cdot \rho_a) \cdot c_m \cdot \frac{D}{2} \quad (1.2)$$

mit der Leitfähigkeit des Zytosol ρ_c , der Leitfähigkeit der Zellsuspension ρ_a und der spezifischen Membrankapazität c_m . Die Werte hängen stark von der Zytosol- und Membranbeschaffenheit (z.B. Cholesterol-Anteil) ab und sind somit je nach Zelltyp unterschiedlich. Typische Werte für die Leitfähigkeit des Zytosols liegen im Bereich von $\frac{1}{70}$ S/cm, die spezifische Membrankapazität beträgt ungefähr $1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ [23, 24]. Genau genommen müssten auch die kapazitiven Anteile des Zytosols und die Leitfähigkeit der Membran berücksichtigt werden, diese werden hier aber vernachlässigt. Die Gleichungen 1.1 und 1.2 zeigen die Abhängigkeit der Änderung der Transmembranspannung vom Durchmesser der Zelle. Folglich erreichen größere Zellen bei gegebener Feldstärke die kritische Transmembranspannung schneller als Zellen mit einem kleineren Durchmesser bzw. sind höhere Feldstärken nötig, um die Porenbildung in kleineren Strukturen zu bewirken. Die Abhängigkeit der Ladezeitkonstante zeigt zudem, dass sich kleinere Strukturen, wie z.B. Zellorganellen, schneller aufladen als die äußere Zellmembran.

Unter der Annahme, dass die Organelle rund ist und sich konzentrisch in der Zelle befindet, kann die Potentialänderung über der Organellenmembran wie folgt beschrieben werden:

$$|\Delta V_o(t)| = (1,5)^2 \cdot E \cdot \frac{d}{2} \cdot e^{-\frac{t}{\tau_c}} \cdot \frac{\tau_c}{\tau_c - \tau_o} \cdot e^{\frac{t}{\tau_c} - \frac{t}{\tau_o}} \quad (1.3)$$

1 Einleitung

mit dem Durchmesser der Organelle d und der Ladezeitkonstante der Organelle τ_o . Die Ladezeitkonstante für Organellen ist analog zu der für Zellen.

Lädt sich gleichzeitig die äußere Membran der Zelle auf, bildet sich in der Zelle ein dem äußeren Feld entgegengerichtetes elektrisches Feld aus, das die subzellulären Strukturen vom äußeren Feld abschirmt. Sollen vorwiegend die intrazellulären Strukturen wie Nukleus, Mitochondrien oder das endoplasmatische Retikulum beeinflusst werden, muss die Pulslänge des angelegten elektrischen Feldes also kürzer sein als die Dauer, die die äußere Membran braucht, um sich aufzuladen. In diesem Zusammenhang spielt auch die Anstiegszeit des elektrischen Pulses eine wichtige Rolle. Idealerweise müsste der angelegte Puls eine unendlich kurze Anstiegszeit haben oder zumindest eine sehr viel kürzere als typische Ladezeitkonstanten, also möglichst rechteckig sein.

Die durch die einfachen elektrischen Modelle gewonnenen Ergebnisse lassen sich durch detaillierte Computersimulationen bestätigen und weiter spezifizieren [25]. Dazu wurde eine Zelle mit Kern, Mitochondrien und endoplasmatischem Retikulum mit den jeweiligen charakteristischen elektrischen Eigenschaften in einem elektrischen Feld mit der dazu gehörenden Feldverteilung simuliert (Abb. 1.4). Die in weiß dargestellten Membranabschnitte veranschaulichen Membranabschnitte, für die eine Änderung von 1 V erreicht wurde.

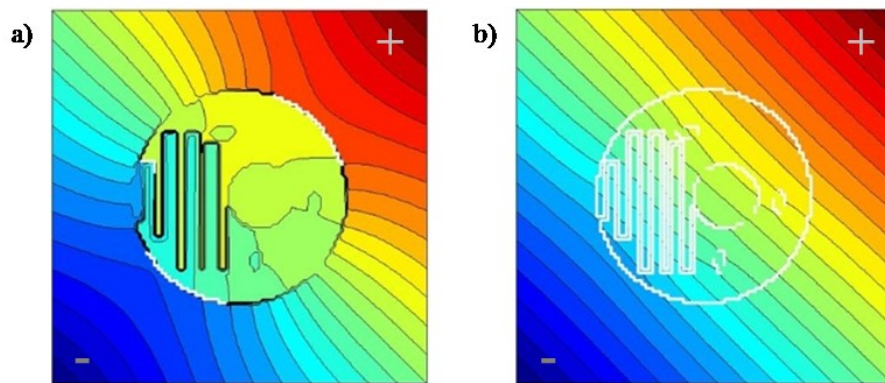


Abb. 1.4*: Simulation der Feldverteilung bei einer Zelle im elektrischen Feld. Im Fall von „konventioneller“ Elektroporation ($110\ \mu\text{s}$, $1,1\ \text{kV/cm}$) geht das elektrische Feld um die Zelle herum (a), während es bei Supra-Elektroporation ($60\ \text{ns}$, $60\ \text{kV/cm}$) durch die Zelle hindurchgeht (b).
*aus [25]

Für den Fall der konventionellen Elektroporation wurde ein Feld mit einer Pulslänge von $110\ \mu\text{s}$ und einer Feldstärke von $1,1\ \text{kV/cm}$ angenommen (Abb. 1.4a). Dabei geht das elektrische Feld gegen Ende des angelegten Pulses um die Zelle herum und nur die äußere, den

Polen zugewandte Membran, lädt sich auf 1 V auf, während die Organellen im Zellinneren unberührt bleiben. Für den Fall der Supra-Elektroporation (Abb. 1.4b) wurde ein 60 ns-Puls und eine Feldstärke von 60 kV/cm angenommen. Im Gegensatz zur konventionellen Elektroporation durchdringt hier das elektrische Feld gegen Ende des angelegten Pulses die Zelle noch vollständig. Durch die hohe Feldstärke laden sich sowohl die komplette äußere Membran als auch die Membranen der subzellulären Strukturen auf 1 V auf.

Der Prozess der Elektroporation besteht aus drei Phasen: dem Aufladen der Membran, der Bildung der ersten Pore und schließlich der Entwicklung weiterer Poren. Die zeitliche Abhängigkeit der Porendichte N kann mit folgender Gleichung nach Smoluchowski beschrieben werden:

$$\frac{dN}{dt} = \alpha e^{\left(\frac{V_m}{V_{ep}}\right)^2} \left(1 - \frac{N}{N_0} e^{-q\left(\frac{V_m}{V_{ep}}\right)^2}\right) \quad (1.4)$$

wobei N_0 die Porendichte für den Fall ist, dass keine Transmembranspannung anliegt ($V_m = 0$ mV). q und α sind Konstanten. V_{ep} ist ebenfalls eine Konstante, die analog einer Zeit- oder Längenkonstanten die charakteristische Transmembranspannung beschreibt, die zu einer e -fachen Erhöhung der Porenbildungs-Rate führt [26].

Die durch Elektroporationspulse (Pulslänge μ s-ms) erzeugten Poren unterscheiden sich in Anzahl, Dichte und Größe von denen, die durch nsPEFs entstanden sind. Zudem hängen sie von der Höhe der applizierten Feldstärke ab. Generell werden alle Membranen, also sowohl die äußere als auch die der Organellen, innerhalb von wenigen zehn Nanosekunden gleichmäßig poriert [25, 27]. Poren, die durch kurze Pulse entstanden sind, sind zahlreicher, mit einem Radius von wenigen Nanometern aber auch wesentlich kleiner als durch Elektroporationspulse erzeugte Poren (Porendurchmesser bis zu 120 nm [28]) [29-31]. Die Bildung unterschiedlicher Porengrößen hat zur Folge, dass sich auch die Ionen, die durch die Poren in der Membran diffundieren können, unterscheiden. Da Ionen eine wichtige Rolle in der Regulation zellulärer Prozesse spielen, wie z.B. bei der Reizleitung in Nerven oder der Osmoregulation der Zelle, können nsPEFs somit andere Effekte nach sich ziehen als klassische Elektroporationspulse.

1.1.3 Biologische Effekte von Nanosekunden gepulsten elektrischen Feldern

Als Folge der unterschiedlichen Aufladevorgänge bzw. Porenbildungsdynamik unterscheiden sich Nanosekunden gepulste elektrische Felder in ihrer biologischen Wirkung auf Zellen von Pulsen mit einer Dauer im Mikro- bis Millisekunden-Bereich, die zur Elektroporation verwendet werden. Zahlreiche Publikationen beschreiben die Induktion der Apoptose nach der Behandlung mit nsPEFs, die sowohl über den extrinsischen Weg, also durch Stress auf die äußere Zellmembran, als auch den intrinsischen Weg, also durch die Freisetzung pro-apoptotischer Faktoren, eingeleitet werden kann [17, 32, 33]. Weiterhin konnte eine Wirkung von nsPEFs auf den Zellkern und die DNA gezeigt werden, die sich in der Porierung der Kernmembran und der Induktion von DNA-Schäden äußert [34-37]. Aufgrund dieser Effekte wurden elektrische Pulse in den letzten Jahren als neue medikamentenfreie Behandlungsmöglichkeit von Krebs, vor allem von Melanomen, untersucht. In Tierversuchen konnte gezeigt werden, dass nsPEFs, auch ohne die Verwendung von Chemotherapeutika, Tumore schrumpfen und sogar zu ihrer vollständigen Rückbildung führen können [38-41]. Weiterhin konnte die den Tumor versorgende Blutzufuhr nachhaltig gestört werden. Zum einen können nsPEFs die Blutzufuhr unterbrechen und zum anderen die Bildung neuer Blutgefäße verhindern [42]. NsPEFs als Krebstherapie haben gegenüber herkömmlichen Behandlungen wie Chemotherapie und Bestrahlung unter anderem den Vorteil, dass durch den schnellen Zelltod die Wahrscheinlichkeit für Resistenzen und Rezidive der Tumore verringert wird und die Nebenwirkungen abgeschwächt werden [40, 43].

Ein weiterer, ausführlich beschriebener Effekt von nsPEFs auf Zellen ist die Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Speichern wie dem endoplasmatischen Retikulum aufgrund der Poration der Organellenmembranen [44-47]. Basierend auf diesem Effekt bieten nsPEFs eine mögliche medizinische Anwendung im Bereich der Wundheilung zur Stillung von Blutungen. Dabei werden Thrombozyten mit elektrischen Pulsen behandelt, was zum Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration und dies wiederum zur Aggregation der Thrombozyten führen kann [48]. Der Vorteil gegenüber bovinem Thrombin, das sonst zur künstlichen Stimulierung der Thrombozytenaggregation, z.B. während Operationen, genutzt wird, ist, dass allergische Reaktionen vermieden werden können.

Des Weiteren können nsPEFs den kompletten Zusammenbruch des Aktin-Zytoskeletts innerhalb weniger Minuten bewirken, vermutlich indem sie zur Depolymerisierung der Aktin-Filamente führen. Dieser Effekt kann ebenfalls reversibel sein [34].

Neben diesen direkten Effekten können neben der Induktion der Apoptose auch weitere intrazelluläre Signalwege in Gang gesetzt werden. Ein Beispiel ist die Aktivierung verschiedener mitogen-aktivierter Proteinkinasen (MAP-Kinasen), die wiederum andere intrazelluläre Prozesse nach sich ziehen können. Als Auslöser für die Aktivierung werden durch die elektrischen Pulse verursachte strukturelle Änderungen in der Plasmamembran vermutet [49].

Viele der beschriebenen Effekte können einen Einfluss auf die Zell-Zell-Kommunikation haben, die wichtig für die Aufrechterhaltung der Homöostase in Geweben ist.

1.2 Zell-Zell-Kommunikation über Gap Junctions

Zellen in einem Gewebeverband unterscheiden sich von einzelnen, isolierten Zellen durch ihre Verbindung zu benachbarten Zellen und ihre Fähigkeit mit diesen zu kommunizieren. In einem Gewebeverband sind die Zytoplasmen von angrenzenden Zellen über Kanäle, so genannte Gap Junctions (GJs), miteinander verbunden, die den direkten Austausch verschiedener Ionen und Moleküle durch Diffusion ermöglichen. Die Zell-Zell-Kommunikation (ZZK) reguliert das Zellwachstum und die Zelldifferenzierung. Zudem ist die ZZK auch an der Regulation der Apoptose (kontrollierter Zelltod) beteiligt, vermutlich durch die Verbreitung eines „Todessignals“ in Form von Ca^{2+} -Ionen. Gleichzeitig korreliert die Expression der GJ-Proteine, unabhängig von der ZZK, invers mit der Apoptose. So wurde gezeigt, dass die chemisch induzierte Inhibierung der ZZK zu einer dosis-abhängigen Herunterregulierung der Apoptoserate führte [50, 51].

Während der Apoptose werden Substanzen freigesetzt, die zur Beseitigung der toten Zelle und zu einer Immunantwort führen. Wird die tote Zelle nicht entfernt, kann es zur Nekrose, Entzündungsreaktion oder einer Autoimmunantwort kommen. Der kontrollierte Zelltod und damit verbunden auch die GJ-vermittelte ZZK sind essentiell für die Homöostase multizellulärer Organismen [52-54]. GJs kommen in fast allen Zelltypen vor. Ausnahmen bilden nur wenige terminal differenzierte Zellen, wie z.B. Skelettmuskel- und Blutzellen [55].

1.2.1 Aufbau, Eigenschaften und Funktionen von Gap Junctions

Gap Junctions sind hydrophile, mit Wasser gefüllte Poren mit einem Porendurchmesser von 1 bis 1,5 nm, die eine direkte Verbindung zwischen angrenzenden Zellen unter Ausschluss des extrazellulären Raumes bilden. Dabei überbrücken sie einen Abstand von ca. 2 nm zwischen den benachbarten Plasmamembranen, der ansonsten normalerweise 20 bis

1 Einleitung

30 nm beträgt [56]. GJs können einzeln auftreten oder sich zu Plaques mit mehr als 10^4 Kanälen pro μm^2 ansammeln [57]. Jeder Kanal wird aus zwei Halbkanälen, den so genannten Connexonen, aufgebaut, die sich jeweils in der Plasmamembran zweier benachbarter Zellen gegenüberliegen. Jedes Connexon besteht wiederum aus sechs hexagonal angeordneten Untereinheiten, den Connexinen (Abb. 1.5) [58, 59].

Connexine sind Transmembranproteine mit vier Transmembrandomänen (M1-M4), zwei extrazellulären (E1, E2) und einer zytoplasmatischen (CL) Schleife und einem zytoplasmatischen N- und C-Terminus. Während die Transmembrandomänen und die extrazellulären Schleifen hochkonservierte Regionen darstellen, können die zytoplasmatischen Anteile stark variieren. Diese Sequenzvariabilität führt zu unterschiedlichen Molekulargewichten der Connexine, nach dem die Connexine, zusammen mit der Abkürzung Cx, benannt sind. So werden beispielsweise Connexine mit einem Molekulargewicht von 43 kDa mit Cx43 bezeichnet [60]. Bislang sind 21 verschiedene Connexintypen im Menschen und 20 in der Maus bekannt.

Je nach Zell- und Gewebeart werden unterschiedliche Connexine exprimiert. Zudem können GJs aus verschiedenen Connexintypen zusammengesetzt sein. Die meisten Zellen exprimieren mindestens zwei verschiedene Arten von Connexinen [60, 61].

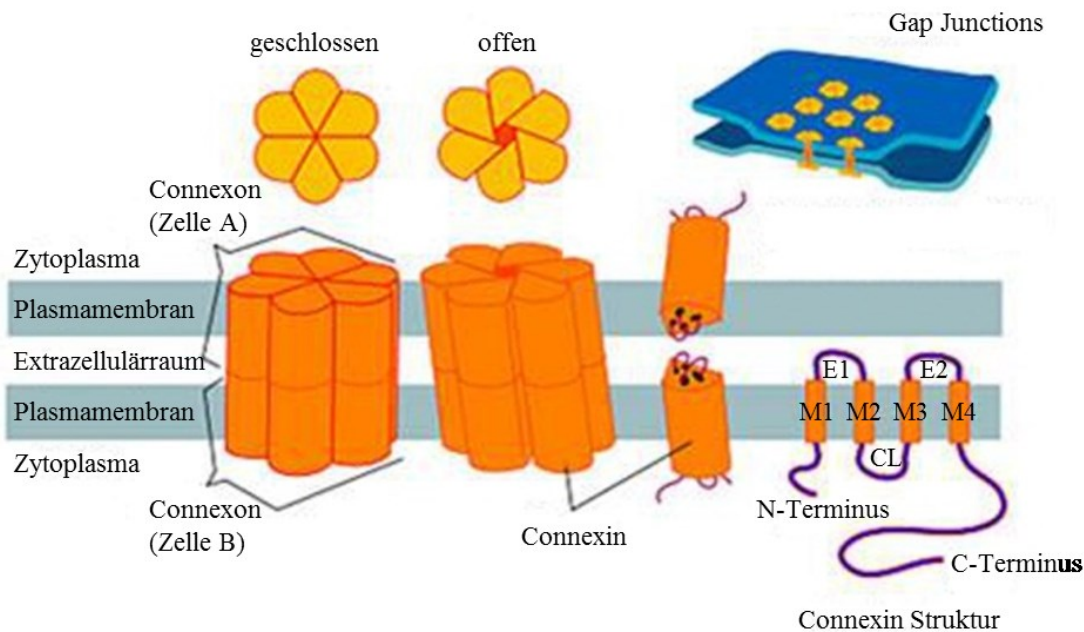


Abb. 1.5*: Schematischer Aufbau von Gap Junctions. M1-M4: Transmembrandomänen; E1 und E2: extrazelluläre Schleifen; CL: zytoplasmatische Schleife.

*Quelle: http://php.med.unsw.edu.au/cellbiology/index.php?title=File:Gap_junction5.jpg

Die unterschiedlichen Connexin-Kombinationen resultieren in einer unterschiedlichen Leitfähigkeit, Permeabilität und Selektivität der GJs, die dadurch vielfältige Funktionen innerhalb biologischer Prozesse ermöglichen [62, 63]. Die elektrische Einzelkanalleitfähigkeit kann, je nach Zusammensetzung der GJs und dem Phosphorylierungsstatus der Connexine, zwischen 20 und 300 pS betragen [64-67]. Die Permeabilität der GJs für bestimmte Moleküle hängt von der Molekülgröße und ihrer Ladung ab. Aufgrund des Porendurchmessers können nur Moleküle mit einer Größe von bis zu 1 kDa den Kanal passieren. Kationen haben wegen der elektrostatischen Wechselwirkung mit den porenbildenden Proteinen eine höhere Durchlässigkeit als Anionen [68-70].

GJs haben verschiedene Aufgaben. Sie erlauben den Austausch niedermolekularer Metabolite und Signalmoleküle zwischen Zellen in einem Gewebeverband. Dazu gehören Aminosäuren, Zucker, Nukleotide und sekundäre Botenstoffe wie cAMP und Calcium [71-73]. Bereits während den frühen Entwicklungsstadien eines Embryos werden Connexine exprimiert, die funktionale GJs ausbilden und eine wichtige Rolle für die Entwicklung des Embryos spielen [74-77]. Durch die Zusammensetzung von GJs aus inkompatiblen Connexinen können Kommunikationsbarrieren aufgebaut werden, die die Bildung von getrennten Kommunikations- und Entwicklungsbereichen ermöglichen [78]. Eine weitere Aufgabe von GJs ist die Versorgung von Zellen mit Nährstoffen, die nicht über den Blutkreislauf versorgt werden können, wie z.B. die Zellen der Augenlinse [79] und die Schichten der Schwann'schen Zelle [80]. Zudem können GJs elektrische Reize in neuronalen sowie nicht neuronalen Geweben weiterleiten. Beispiele hierfür sind die Erregungsleitung im Herzen [81], die Kontraktion der Uterusmuskulatur während der Geburt [82, 83] und die Koordination der Darmperistaltik [84].

1.2.2 Lebenszyklus und Regulation der Gap Junctions

Connexine werden im endoplasmatischen Retikulum (ER) synthetisiert. Anschließend durchlaufen sie den Golgi-Apparat, wo sie phosphoryliert¹ werden, bevor sie in Vesikeln zur Plasmamembran transportiert werden. Die Connexine werden typabhängig im ER oder im *trans*-Golgi-Netzwerk (TGN) zu Connexonen zusammengesetzt und in geschlossenem Zustand zufällig verteilt in die Membran eingebaut, wo sie an bereits existierenden oder neu geformten GJs akkumulieren. Zum Ausbilden neuer GJs docken zwei Connexone

¹ Phosphorylierung = das reversible Anhängen einer Phosphatgruppe an ein Protein: eine der wichtigsten Regulationsmöglichkeiten von biologischen Prozessen in der Zelle, z.B. durch Konformationsänderungen des Proteins, so dass es zwei funktionell verschiedene Formen des Proteins gibt (aktiviert oder inaktiviert)

1 Einleitung

durch nicht-kovalente Wechselwirkungen zwischen den extrazellulären Schleifen aneinander. Voraussetzung ist die Zelladhäsion, vor allem über Cadherine. In der Plasmamembran werden die Connexine weiter phosphoryliert [85].

GJs haben je nach Zell- und Connexintyp eine relativ kurze Halbwertszeit, die *Turnover-Rate* für Cx43 beträgt ca. 1-3 h [86, 87]. Zum Abbau von GJs werden diese zunächst als annuläre GJs internalisiert, die es erlauben, mehrere hundert Kanäle auf einmal aus der Plasmamembran zu entfernen. Anschließend werden die GJs über Lysosome, und wahrscheinlich auch Ubiquitin-abhängig über Proteasome, abgebaut [85].

Zellen können den Austausch von Molekülen über verschiedene Mechanismen regulieren. Dazu gehören der Kanaltyp und die damit verbundene Selektivität, aber auch die Anzahl der GJs in der Plasmamembran und deren funktionaler Zustand. Das Öffnen und Schließen der GJs wird durch eine Konformationsänderung der Kanalproteine reguliert, wodurch mehrere Öffnungsgrade möglich sind. Posttranslationale Modifikationen der Connexine, insbesondere Phosphorylierungen, haben sowohl beim Auf- und Abbau als auch beim Öffnen und Schließen der GJs eine regulierende Funktion. Connexine haben zahlreiche Phosphorylierungsstellen, die sich vor allem am C-Terminus befinden und durch verschiedene Stimuli wie Proteinkinasen oder Phosphatasen modifiziert werden können [88-90].

Die Menge der Connexone und somit auch der GJs in der Zellmembran hängt von der Connexinexpression und dem korrekten Transport zur Membran ab. Weiterhin müssen die Connexone richtig in die Membran eingebaut und zu GJs zusammengelagert werden. Abgesehen von der Expression werden diese Prozesse über Phosphorylierungen reguliert [90-92]. Zudem wird für den Auf- und Abbau von GJs ein intaktes Zytoskelett benötigt. Dabei wird die ZZK zum einen direkt durch Interaktionen der GJs mit zytoskelettalen Elementen beeinflusst und zum anderen indirekt durch Transportmechanismen der GJs entlang des Zytoskeletts zur Plasmamembran [93, 94]. Auch an der Lokalisierung von Connexin ist das Zytoskelett beteiligt. Es wird vermutet, dass das Tight Junction Protein ZO-1 (Zonula Occludens) Connexin mit Aktin verbindet und zudem am *Turnover* der GJs beteiligt sein könnte. Eine funktionelle Beteiligung von ZO-1 an der Bildung von GJs scheint allerdings eher unwahrscheinlich [95-98].

Ob die Phosphorylierung der Connexine zu einer verminderten oder erhöhten ZZK führt, hängt vom Zelltyp und der Phosphorylierungsstelle ab. Welche Phosphorylierungsstelle modifiziert wird ist wiederum von den verantwortlichen Modulatoren abhängig (Abb. 1.6). Dabei kann eine Phosphorylierungsstelle auch von mehreren Kinasen phosphoryliert werden. Häufig werden MAP-Kinasen aktiviert, die zur Phosphorylierung von Cx43 und zur

Inhibierung der ZZZK führen. Außerdem hängen sowohl der Phosphorylierungsstatus der Connexine als auch die ZZZK stark vom Zellzyklus ab. Die Phosphorylierung nimmt während der S- und M-Phase im Vergleich zur G0/G1-Phase zu, während die ZZZK in der M-Phase drastisch vermindert ist und sich während der G1-Phase allmählich erholt [99].

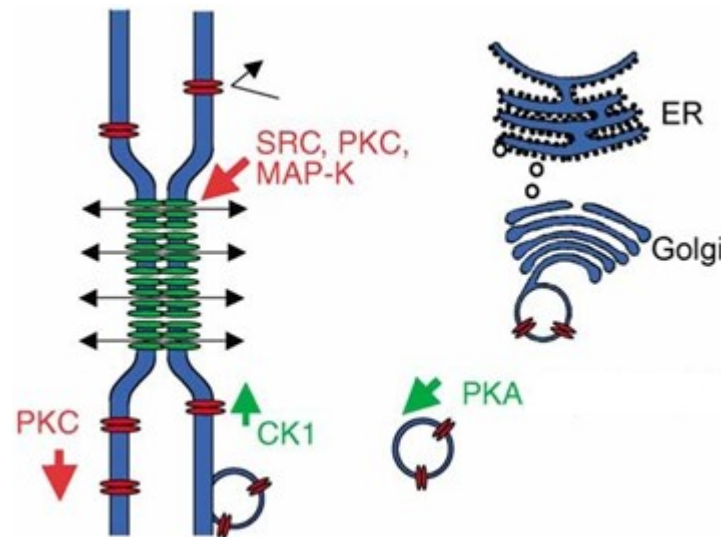


Abb. 1.6*: Cx43 wird im endoplasmatischen Retikulum (ER) gebildet und im *trans*-Golgi-Netzwerk (TGN; Golgi) zu Connexonen zusammengesetzt. Die Halbkanäle werden in Vesikeln zur Plasmamembran transportiert und dort zufällig verteilt eingebaut. Im Normalfall können Zellen nach der Ausbildung von GJs miteinander kommunizieren (Doppelpfeile), während Halbkanäle normalerweise geschlossen sind (abgeknickter Pfeil). Verschiedene Proteinkinasen können die ZZZK stimulieren (grün) oder inhibieren (rot). Proteinkinase A (PKA) stimuliert den Transport der Connexine zur Membran und Caseinkinase 1 (CK1) fördert ihren Zusammenbau zu GJs. Proteinkinase C (PKC) wirkt dem Aufbau der GJs entgegen und führt zum Verschließen der Kanäle, wie auch die Tyrosinkinase SRC und MAP-Kinasen. *nach [88]

Der Öffnungszustand der GJs wird auch über andere Faktoren, unabhängig von der Phosphorylierung, reguliert. Sowohl ein Absinken des intrazellulären pH-Wertes als auch ein Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration bewirken eine Verringerung der Kanal-Leitfähigkeit [100]. Auch das Membranpotential kann einen Einfluss auf den Öffnungszustand haben. Mit steigender transjunktionaler Spannung, gleich, welcher Polarität, oder mit fallender Transmembranspannung sinkt die Leitfähigkeit. Weitere Modulatoren sind der Glukosespiegel, Onkogene, Tumorpromotoren und Wachstumsfaktoren [85, 101-103].

1.2.3 Zell-Zell Kommunikation, Connexine und Krankheiten

Die ZZZK ist wichtig für die Regulation von Wachstum, Differenzierung und Entwicklung von Zellen. Bereits im 8-Zellen-Stadium in der Embryogenese bilden sich bei Vertebraten

1 Einleitung

GJs aus und steuern die meiotische Reifung [101]. Treten Mutationen in den Connexin-Genen auf, kann dies eine Vielzahl von Erkrankungen zur Folge haben. Cx32-Mutationen werden mit der X-gebundenen Form der erblichen Charcot-Marie-Tooth-Krankheit in Verbindung gebracht [104]. Dabei kommt es zur progressiven Muskelatrophie, verursacht durch die Degeneration der Myelinscheiden und der Schädigung der peripheren Nerven. Folglich wird die saltatorische Erregungsleitung gestört, was zur Schwächung und schließlich zum Abbau der Muskulatur führt.

Mutationen können an verschiedenen Stellen in Genen auftreten. So können Mutationen an einem Connexin sowohl zum Hörverlust als auch zu Hauterkrankungen führen. Connexine spielen eine wichtige Rolle bei der akustischen Signaltransduktion im Innenohr, indem sie über die Regulierung von Ionenkanälen das Membranpotential aufrechterhalten. Eine rezessive Mutation im Cx26-Gen, einem in der Cochlea weit verbreiteten Connexin, führt zum nicht-syndromalen Hörverlust, ebenso wie Mutationen von Cx30 und Cx31. Dieselben Connexine werden auch mit Hauterkrankungen assoziiert. Eine dominante Mutation in Cx26 kann zur epidermalen Verhornungsstörung führen, bei der die Haut an Handtellern und Fußsohlen verdickt ist. Mutationen in den Genen von Cx30 und Cx31 können unabhängig voneinander die Hautkrankheit *Erythrokeratoderma variabilis* auslösen, bei der es zur Bildung von transienten roten Flecken und einer Hyperkeratose kommt. Während Cx26-assoziierte Hauterkrankungen mit Hörstörungen einhergehen, ist dies bei Cx31-Mutationen nicht zwingend der Fall [105-108].

Mutationen im Cx46-Gen können zu einem angeborenen Katarakt führen, genauso wie eine Cx50-Mutation, bei der es zusätzlich zu einer Inhibierung des Augenwachstums kommt [105, 107].

Neben genetisch bedingten Erkrankungen spielt die ZZZ auch eine wichtige Rolle bei der Krebsentstehung, vor allem in der Promotionsphase. Die meisten initiierten Zellen können weder untereinander, noch mit den gesunden Zellen in ihrer Umgebung kommunizieren, da sie nur unzureichend Connexine exprimieren oder nicht in der Lage sind diese richtig zu funktionsfähigen GJs in die Plasmamembran einzubauen. Dadurch entziehen sich die Tumorzellen der Kontrolle ihrer gesunden Nachbarzellen, da keine Signale, z.B. zur Wachstumskontrolle, mehr übermittelt werden können. Die Folgen sind eine klonale Expansion der initiierten Zellen, die Entstehung zusätzlicher Mutationen und schließlich ihre komplette neoplastische Transformation. Krebszellen können die Fähigkeit zur ZZZ wiedererlangen, z.B. durch die Transfektion mit Connexinen oder die Behandlung mit chemopräventiven Wirkstoffen, wie Carotenoiden oder Retinoiden. In der Folge verringert

sich auch das unkontrollierte Zellwachstum und die Fähigkeit verankerungsunabhängig zu wachsen [109-113].

Die direkte Kommunikation über GJs ist darüber hinaus auch entscheidend für eine korrekte Wundheilung. Sie reguliert das Gleichgewicht von Zytokinen, Chemokinen und Wachstumsfaktoren in den Zellen und somit wichtige Funktionen wie Migration, Proliferation und Matrixsynthese. In akuten Wunden wird die Expression von Cx43 innerhalb von 5 h herunterreguliert und Cx43 ist weder in der Wunde noch am Wundrand nachweisbar. Auch Cx26 und Cx30 sind in dieser Phase nur schwach in der näheren Umgebung der Wunde exprimiert. Nach 24 - 48 h sind Cx26 und Cx30, im Gegensatz zu Cx43, an den Wundrändern nachweisbar. Nach 5 - 6 Tagen, wenn sich die Epidermis vollständig regeneriert hat, kann Cx26 und Cx30 in allen Hautschichten gefunden werden, während die Cx43-Expression immer noch unterhalb des Kontrollniveaus liegt. Im Vergleich hierzu ist die Connexin-Expression in chronischen Wunden, wie z.B. diabetischen Ulcera, stark verändert. Cx26 und Cx30 sind sowohl in der Wunde als auch an den Wundrändern nachweisbar. Die Expression von Cx43 ist signifikant erhöht. Die Isolation der verletzten Zellen von der gesunden Umgebung scheint also ein entscheidender Schritt in der Wundheilung zu sein [114-117].

1.3 Zusammenhang von Zellelastizität, Malignität und Invasivität

Ein intaktes Zytoskelett ist nicht nur für die ZZZK essentiell, wobei es für den Aufbau von GJs benötigt wird, sondern bestimmt auch maßgeblich die Elastizität einer Zelle. Das Zytoskelett ist eine komplexe Proteinstruktur, bestehend aus Aktin, Mikrotubuli und Intermediärfilamenten, die maßgeblich die mechanischen Eigenschaften von Zellen bestimmt und ihnen ihre mechanische Festigkeit verleiht [18]. Zudem ist es an der Regulation der Zellproliferation und Differenzierung beteiligt, indem wachstumsbezogene Signale über das Zytoskelett zum Kern weitergeleitet werden [118]. In kernhaltigen Zellen bildet das Aktin eine Art Stützkorsett in Form eines ca. 0,5 µm dicken Kortex, der die Zelle stabilisiert. Dieser ist intrazellulär über Kopplungsproteine an Rezeptoren in der Plasmamembran gebunden, was den Zellen eine hohe Scherfestigkeit verleiht [119]. Unter dem Aktinkortex, im Zytoplasma, existiert ein wesentlich weicherer Teil, der vor allem Intermediärfilamente enthält. Dieser stabilisiert die intrazellulären Kompartimente, hat jedoch keinen signifikanten Einfluss auf die Steifigkeit des Kortex [120].

1 Einleitung

Während der Entwicklung von Krebs durchlaufen die Zellen verschiedene Phasen, in denen sich auch ihre Steifigkeit, die mithilfe des Elastizitätsmoduls (Youngscher Modul) beschrieben werden kann, ändert. Über ihre mechanischen Eigenschaften lassen sich somit Krebszellen von gesunden Zellen unterscheiden. Zahlreiche Publikationen beschreiben, dass Tumorzellen generell weicher als ihr nicht-tumorigener Gegenpart sind, was vor allem an einer Umstrukturierung des Aktin-Zytoskeletts liegt [118, 121-124]. Vermutlich wird die Umstrukturierung des Zytoskeletts durch Onkogene induziert, die Bestandteile der Adhäsionsplaques phosphorylieren bzw. zur Produktion bestimmter Proteine (z.B. pp60) führen können, die für die Strukturänderungen verantwortlich sind [118, 122]. So konnte gezeigt werden, dass der Elastizitätsmodul von kanzerogenen humanen Zellen der Blase im Vergleich zu dem von nicht-kanzerogenen Blasen Zellen um etwa eine Größenordnung niedriger war [121]. Metastasierende Zellen aus Patientenproben von Lunge, Brust und Pankreas waren über 70 % weicher als gesunde Zellen aus den gleichen Organen, wobei die Standardabweichung bei den Krebszellen über 5-mal enger ist [125]. Ein sehr ähnliches Ergebnis lieferten Untersuchungen an Patienten-Effusionszellen. Die metastasierenden Zellen waren über 80 % weicher als die gesunden Zellen, mit einer mehr als 6-mal engeren Verteilung der Elastizitätsmoduln [126].

Neben der Unterscheidung zwischen malignen und gesunden Zellen können anhand der Zellelastizität auch Rückschlüsse auf das Metastasierungspotential von Tumorzellen geschlossen werden. Deshalb wird die Bestimmung der Zellelastizität als neues Diagnosewerkzeug zur medizinischen Prognose bei Krebsleiden untersucht. Um Metastasieren zu können, müssen sich einzelne Zellen aus dem Gewebeverband lösen und fortbewegen können. Ihre Motilität beruht hauptsächlich auf der Umstrukturierung des Aktin-Zytoskeletts [127, 128]. Am Beispiel von verschiedenen humanen Ovarialzelllinien mit unterschiedlichem Metastasierungspotential konnte nachgewiesen werden, dass die Krebszellen mit dem höchsten Migrations- und Invasionspotential 5-mal weicher waren als die Zellen mit dem niedrigsten Potential [129].

NsPEFs können den Elastizitätsmodul von Zellen senken. Es stellt sich daher die Frage, ob somit auch weitere mit dem Aktinskelett verbundene Charakteristika durch nsPEFs beeinflusst werden. Insbesondere, ob die so behandelten Zellen ein höheres Migrations- und Invasionspotential aufweisen.

1.4 Zielstellung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung von nsPEFs auf Zellen in einem Monolayer untersucht. Bisher sind die grundlegenden Auswirkungen von nsPEFs auf Zellen in einem Gewebeverband nur wenig erforscht. Die meisten Studien fokussierten sich auf die Untersuchung fundamentaler Mechanismen an einzelnen Zellen oder die Durchführung von Versuchen an Tieren, um die Wirksamkeit von Behandlungen zu testen. Zu verstehen, wie Zellen in einem Verbund auf nsPEFs reagieren, und ein besseres Verständnis der den Effekten zugrundeliegenden Mechanismen, sind jedoch eine wichtige Voraussetzung für die Entwicklung neuer biomedizinischer Anwendungen von elektrischen Pulsen.

Es sind viele Effekte von nsPEFs auf einzelne Zellen bekannt, die auch die ZZZK beeinflussen können, wie z.B. die Änderung des Membranpotentials, die Freisetzung von intrazellulärem Ca^{2+} und die Aktivierung von MAP-Kinasen. Deshalb liegt die Vermutung nahe, dass nsPEFs auch einen Einfluss auf die ZZZK haben können. Den Einfluss von nsPEFs auf die Kommunikation zwischen Zellen in einem Gewebe zu verstehen, könnte dazu beitragen, die Behandlung von Krankheiten, die auf einer gestörten ZZZK basieren, zu verbessern. Somit lag der Fokus der vorliegenden Arbeit auf der Untersuchung der ZZZK von tumorigenen und nicht-tumorigenen Zellen und der Aufklärung der dem Effekt zugrundeliegenden Mechanismen.

Im Gegensatz zu den meisten anderen Studien zu Effekten von elektrischen Pulsen auf Zellen wurden die Versuche für die vorliegende Arbeit an Monolayern durchgeführt. Dabei sind die Zellen, ähnlich wie in einem Gewebe, miteinander verbunden und kommunizieren. Als Zelllinie wurden nicht-tumorigene Rattenleberepithelzellen (WB-F344) gewählt, die dafür bekannt sind, anders als die meisten anderen Zelllinien, auch *in vitro* über Gap Junctions zu kommunizieren. Zudem stehen Tumorzellen (WB-ras) vom selben Ursprung wie die normalen Rattenleberepithelzellen zur Verfügung, die die Ergebnisse direkt miteinander vergleichbar machen.

In dieser Studie, in der zum ersten Mal die Effekte von nsPEFs auf die ZZZK untersucht wurden, konnte eine Inhibierung der ZZZK nachgewiesen werden. Dabei kommen mehrere mögliche Mechanismen in Frage, deren Zusammenhänge in Abb. 1.7 dargestellt sind und aus denen sich die in dieser Arbeit vorgestellten Experimente ergeben.

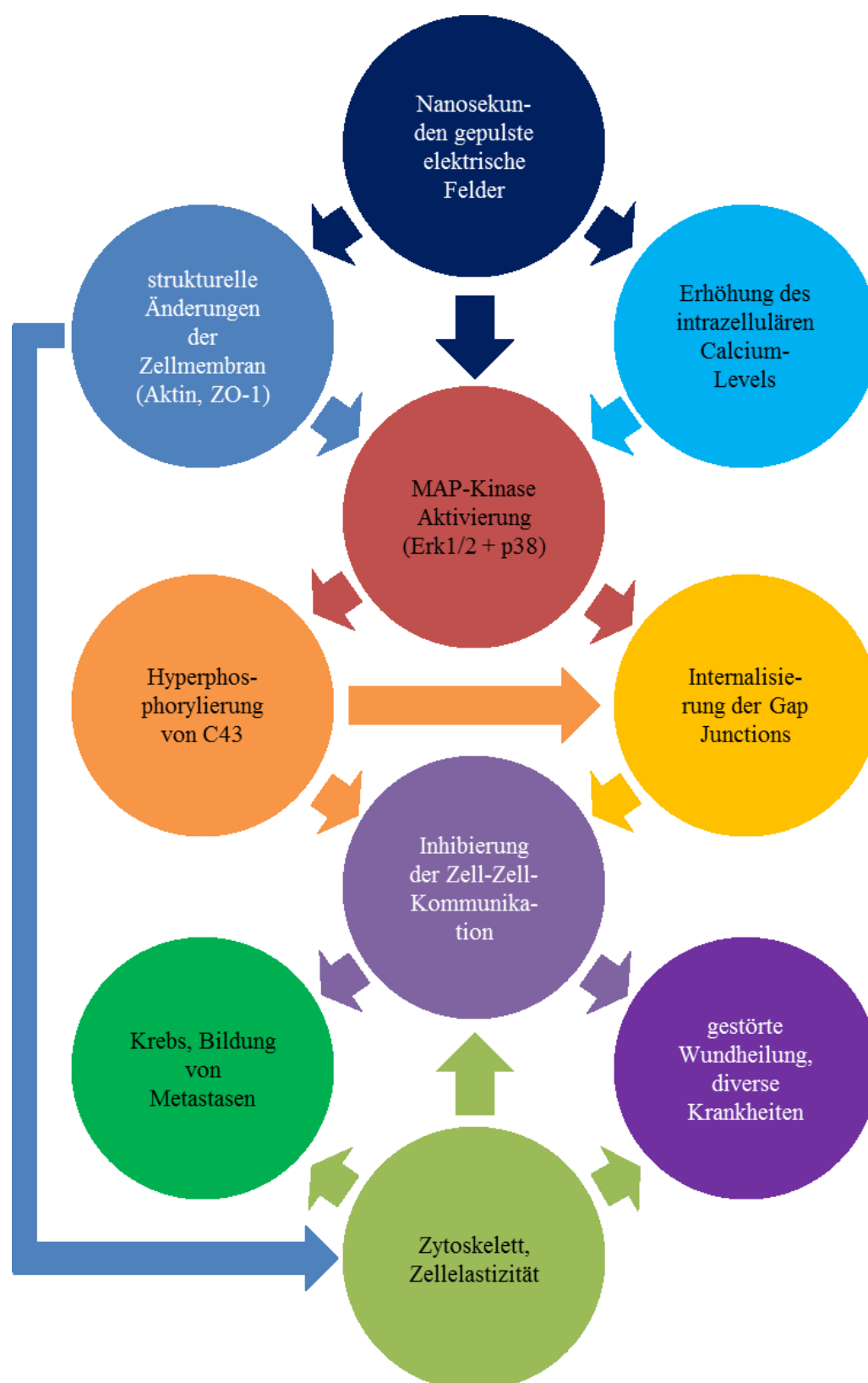


Abb. 1.7 Schematische Übersicht über die möglichen Wirkmechanismen von nsPEFs auf die ZZK und über die Zusammenhänge von ZZK, Zellelastizität und verschiedenen Krankheiten.

Die Kommunikation über GJs wurde mittels Fluoreszenzfarbstoff-Transfer Assay analysiert. Aufgrund des zeitlichen Verlaufs der Inhibierung der ZZZK konnten daraufhin sowohl die Depolarisation der Plasmamembran als auch die Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Speichern als mögliche Ursachen weitestgehend ausgeschlossen werden.

Die Verteilung von Cx43 in der Zelle wurde mit Hilfe von Immunfluoreszenz sichtbar gemacht, um zu überprüfen, ob GJs aus der Membran abgebaut worden sind oder sich die Kanäle nur geschlossen hatten. Anschließend wurde eine Proteinanalyse mittels Western Blot durchgeführt, die Aufschluss darüber geben sollte, ob MAP-Kinasen aktiviert oder Cx43 hyperphosphoryliert wurde, da beides zur Internalisierung von GJs führen kann. Zudem können MAP-Kinasen auch die Genexpression beeinflussen, weshalb zusätzlich mittels qPCR der mRNA-Level von Cx43 ermittelt wurde.

MAP-Kinasen können unter anderem durch strukturelle Änderungen der Plasmamembran aktiviert werden. Diese strukturellen Änderungen können wiederum durch eine Umstrukturierung des Zytoskeletts hervorgerufen werden. Zudem verbindet das Tight Junction Protein ZO-1, das auch für den engen Zusammenhalt von Zellen in einem Verband mitverantwortlich ist, Connexin mit Aktin. Deshalb wurden sowohl F-Aktin als auch ZO-1 mittels Immunfluoreszenz angefärbt, um mögliche Änderungen erkennen zu können.

Neben der Aktivierung von MAP-Kinasen kann sich ein nicht intaktes Zytoskelett auch direkt auf die ZZZK auswirken, da Aktin essentiell am Auf- und Abbau von GJs beteiligt ist. Zusätzlich ist das Zytoskelett, vor allem das Aktin, auch für die mechanischen Eigenschaften von Zellen verantwortlich. Die Umstrukturierung oder der Zusammenbruch des Zytoskeletts können somit zu einer Erniedrigung der Zellelastizität führen. Die mechanische Stabilität von Zellen ist insgesamt ein wichtiger Parameter bei der Krebsentstehung und der Metastasenbildung. Deshalb wurde die Elastizität der Zellen mittels Rasterkraftmikroskopie untersucht. Da die Messungen zeigten, dass die Zellen nach der Behandlung mit nsPEFs weicher wurden, könnte man vermuten, dass das Applizieren von elektrischen Pulsen in normalen Zellen tumorigene Eigenschaften, wie die Fähigkeit zum verankerungsunabhängigen Wachstum, hervorrufen oder zur Bildung von Metastasen führen könnte. Diese möglichen Auswirkungen wurden *in vitro* mittels Soft Agar Colony Formation Assay und Scratch Assay untersucht.

2 Material und Methoden

2.1 Zellkultur

Für die vorliegende Arbeit wurden die Stammzell-ähnlichen Rattenleberepithelzellen WB-F344 verwendet [130]. Diese stammen phänotypisch von der normalen Leber einer erwachsenen Fischer-Ratte ab. Sie zeichnen sich durch eine hohe Expression von Cx43 aus und haben, im Gegensatz zu den meisten anderen Zelllinien, die Eigenschaft auch *in vitro* über GJs zu kommunizieren [131-134].

Die WB-F344 Zellen wurden in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, 1 g/l Glukose), ergänzt mit 5 % hitzeinaktiviertem fötalem Kälberserum (FCS), 2 mM L-Glutamin, 0,1 mg/ml Streptomycin und 100 U/ml Penicillin, bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Alle drei bis vier Tage wurden die Zellen passagiert. Zum Ablösen vom Substrat wurden die Zellen zunächst für 5 min mit PBS/EDTA (5 mM EDTA in PBS) und anschließend für 7 min mit 0,25 %-igem Trypsin inkubiert. Die Zellzählung erfolgte mithilfe einer Trypanblau-Färbung (0,2 %, Hofmann-La Roche AG, Basel, CH) unter Verwendung einer Neubauer-Zählkammer.

Weiterhin wurden auch Krebszellen untersucht, um festzustellen, ob diese anders reagieren als die normalen Zellen. Dazu wurde die Zelllinie WB-ras verwendet. Hierbei handelt es sich um dieselbe Zelllinie wie die normalen Zellen, die jedoch mit dem Proto-Onkogen *ras* transformiert wurden. Damit haben beide Zelllinien denselben Ursprung und die Versuchsergebnisse können direkt miteinander verglichen werden. Die Tumorzellen wurden in sogenanntem CCD-Medium kultiviert. Das CCD-Medium bezieht sich auf modifiziertes Eagle's Minimum Essential Medium (MEM), das unter dem Namen „D-Medium“ von C. C. Chang an der Michigan State University entwickelt und verwendet wurde [135]. Verglichen mit Eagle's MEM enthält das CCD-Medium Earl's balanced salt solution, allerdings mit 1 g/l Natriumhydrogencarbonat und 7,635 g/l Natriumchlorid, 1,5-fach erhöhter Konzentration aller Vitamine und essentieller Aminosäuren, 2 mM L-Glutamin, 0,2 mM aller nicht-essentieller Aminosäuren und 1 mM Natriumpyruvat. Schließlich wurden dem Medium ebenfalls 5 % FCS, 0,1 mg/ml Streptomycin und 100 U/ml Penicillin zugefügt. Das Passagieren der Zellen erfolgte genau wie bei den WB-F344 Zellen.

Zur Weiterkultivierung wurden für beide Zelllinien jeweils $1,5 \times 10^6$ Zellen in 75 cm² Zellkulturflaschen ausgesät. Für die Behandlung mit nsPEFs wurden die Zellen mit einer

Dichte von 40.000 Zellen pro cm^2 Substratfläche in 12-Well Platten oder 35 mm-Petrischalen ausgesät und für ca. 48 h bis zur Ausbildung einer konfluenten Zellschicht (Monolayer) inkubiert.

Sowohl die WB-F344 als auch die WB-ras Zellen wurden von Dr. Pavel Babica (Masaryk University, Brno, Tschechische Republik) zur Verfügung gestellt, mit Genehmigung von Dr. James E. Trosko (East Lansing, MI, USA).

2.2 Erzeugung von Nanosekunden gepulsten elektrischen Feldern

Zum Erzeugen der Nanosekunden gepulsten elektrischen Felder wird ein Pulsgenerator, basierend auf dem Prinzip einer Blumlein Wellenleiterschaltung [136], verwendet (Abb. 2.1).

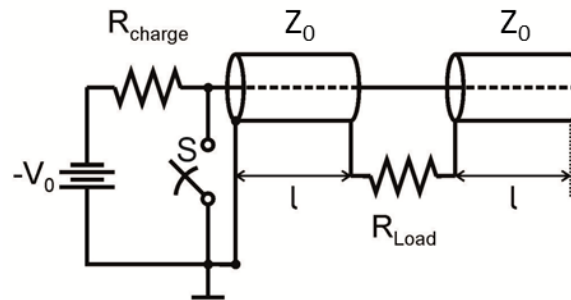


Abb. 2.1 Schematischer Aufbau eines Blumlein-Pulsgenerators. Beim Schließen des Schalters S wird ein Rechteckpuls erzeugt. Die Pulsdauer wird durch die Kabellänge l und die Feldstärke über der Probe durch die angelegte Spannung V_0 und den Abstand der Elektroden festgelegt. *aus [38]

Dieser besteht im Wesentlichen aus zwei gleich langen Koaxialkabeln, durch deren Länge die Pulsdauer bestimmt wird [17]. Der Zusammenhang zwischen Pulsdauer t und Kabellänge l für die Wellenleitung in einem Koaxialkabel, in dem ein Dielektrikum mit der relativen Permittivität ϵ_r verwendet wird, kann durch folgende Gleichung beschrieben werden:

$$t = \frac{l \cdot \sqrt{\epsilon_r}}{c} \quad (2.1)$$

mit der Vakuumlichtgeschwindigkeit c . Das Kabel wird über eine angeschlossene Spannungsquelle aufgeladen, die durch einen hochohmigen Ladewiderstand R_{charge} getrennt ist. Beim Schließen des Schalters S wird der Wellenleiter an einem Ende kurzgeschlossen, während das andere Ende offen bleibt. Die im Kabel hin- und herlaufenden Wellen überlagern sich an der angeschlossenen Last zu einem idealerweise unipolaren Rechteckpuls.

Real wird die Anstiegszeit des Pulses dadurch bestimmt, wie schnell der Schalter geschlossen werden kann. Stimmt der Widerstand der Probe R_{load} mit der Impedanz der Blumlein-Konfiguration $2Z_0$ überein, entspricht die Amplitude des Pulses der Amplitude der angelegten Spannung V_0 .

2.3 Behandlung von Zellen mit nsPEFs

Der Versuchsaufbau besteht neben dem Blumlein-Pulsgenerator aus einer Spannungsquelle (FX20R15, Glassman, High Bridge, NJ), einem Oszilloskop (TDS3054, Tektronix, Beaverton, OR) und einem Hochspannungstastkopf (P5100A, Tektronix, Beaverton, OR) (Abb. 2.2). Für die Versuche wurde eine Pulslänge von 100 ns gewählt. Pulse mit dieser Länge rufen vorwiegend intrazelluläre Effekte hervor und wirken sich kaum auf die äußere Zellmembran aus. Zudem wurden 100 ns-Pulse bereits in zahlreichen Studien angewendet [38, 41, 43, 137, 138]. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung subletaler Effekte, weshalb eine Pulszahl von 20 oder 100 Pulsen mit eher moderaten Feldstärken zwischen 5 und 35 kV/cm (in 5 kV/cm Schritten) gewählt wurde. Die Monolayer wurden in Vollmedium und ohne gesonderten Mediumswechsel vor dem Applizieren der Pulse behandelt.

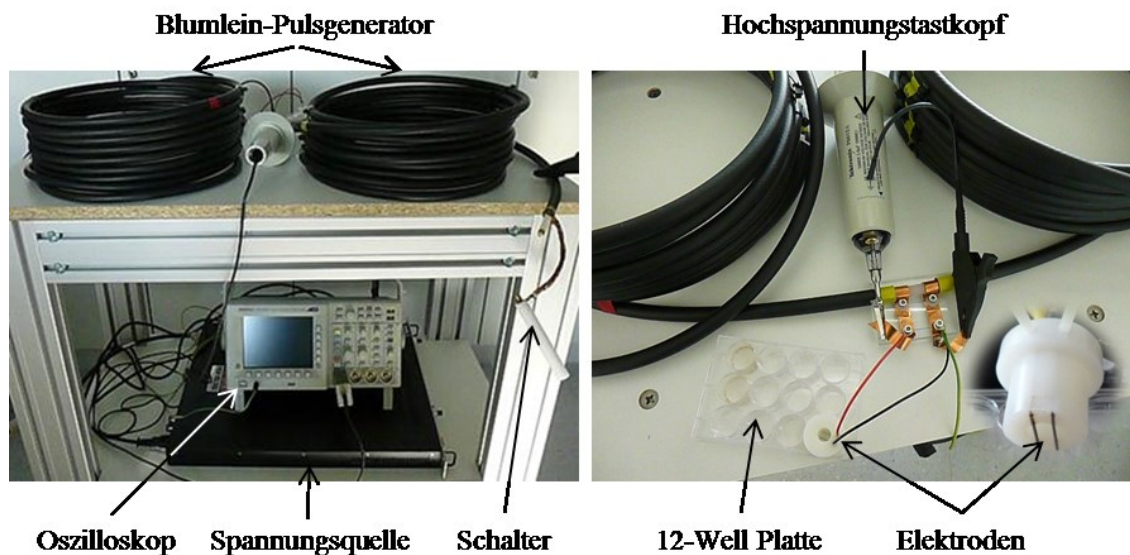


Abb. 2.2 Versuchsaufbau mit dem selbstgebauten Blumlein-Pulsgenerator zur Behandlung der Zell-Monolayer mit gepulsten elektrischen Feldern.

Die Elektroden bestanden aus zwei parallelen, rostfreien Stahldrähten mit einem Durchmesser von 0,8 mm, die in einem Abstand von 5 mm, jeweils von der Mitte der Drähte aus gemessen, angeordnet waren. Die Elektroden wurden so in einen Plastikzylinder, der genau in ein einzelnes Well einer 12-Well Platte passte, eingebettet, dass etwa 40 % ihres Durchmessers (ca. 0,3 mm) über die Auflagefläche überstand. Dadurch wurden die Elektroden zur Behandlung der Zellen leicht in die Zellen eingedrückt, so dass sich das elektrische Feld im und über dem Monolayer ausbreiten konnte.

2.4 Bestimmung der Zellvitalität

Um den Parameterbereich zu bestimmen, den die meisten Zellen überleben, wurden die Zellen nach der Behandlung mit nsPEFs auf ihre Vitalität untersucht. Dazu wurde ein MTT-Test durchgeführt, bei dem der wasserlösliche Farbstoff 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) durch NADH und NADPH in ein violette, wasserunlösliches Formazan reduziert wird, das mittels eines Spektrophotometers detektiert werden kann. Die Menge des umgesetzten Farbstoffs entspricht der Glykolyserate der Zellen und ist somit ein Maß für ihre Vitalität.

Innerhalb von 10 min nach der Behandlung der Zell-Monolayer mit nsPEFs wurde das Medium über den Zellen gegen 500 µl frisches Medium mit 50 µl MTT-Lösung (5 mg/ml MTT in PBS; AppliChem, Darmstadt) ausgetauscht und die Zellen für 2 Std. bei 37 °C inkubiert. Dann wurde die MTT-Lösung entfernt und die Zellen einmal mit HBSS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in einer Zellyse-Lösung (99,4 ml Dimethylsulfoxid (DMSO), 0,6 ml Essigsäure (100 %), 10 g Sodiumdodecylsulfat (SDS)) aufgelöst. Nach einer 5-minütigen Inkubation und weiteren 5 min auf einem Schüttler wurde die Zell-Lösung bei 550 nm mit einer Referenz-Wellenlänge von 700 nm mit einem Photometer (Infinite M200 PRO, Tecan, Männedorf, Schweiz) vermessen.

Für die Auswertung wurden die Absorptionswerte der behandelten Flächen ins Verhältnis zu denen der unbehandelten gesetzt. Dazu wurden die Werte von Wells mit ausschließlich unbehandelten Zellen als Kontrolle genutzt und unter der Annahme, dass alle Zellen vital waren, auf 100 % gesetzt. Die Fläche zwischen den Elektroden, d.h. die behandelte Fläche, betrug 23,5 % vom gesamten Well, die restliche Fläche dementsprechend 76,5 %. So konnte mit folgender Gleichung aus den Absorptionswerten der behandelten Wells ein Absorptionswert x nur für die behandelten Zellen berechnet werden:

$$\text{Absorption (behandeltes Well)} = 0,765 \cdot \text{Absorption (Ktrl)} + 0,235 \cdot x \quad (2.2)$$

Insgesamt wurden 4 unabhängige Experimente durchgeführt, wobei die Werte für jedes Experiment wiederum in Triplets bestimmt wurden. Für die Auswertung wurden aus den Triplets Mittelwerte gebildet und mit diesen Mittelwerten wurde der Standardfehler bestimmt.

2.5 Nachweis von Elektroporation

Die mögliche Elektroporation der Zellmembran ist bei ausreichender Feldstärke und Pulsdauer ein charakteristisches Merkmal der Anwendung elektrischer Felder auf Zellen. Die Bildung von Poren in der Zellmembran wurde über die Aufnahme von Propidiumiodid (PI) getestet. PI ist ein DNA-interkalierender Farbstoff mit einem Molekulargewicht von 668,4 Da, der für gesunde Zellen nicht membrangängig ist. Ist die Zellmembran jedoch beschädigt, wie z.B. bei toten oder elektroporierten Zellen, dringt PI in die Zelle ein und bindet dort an die DNA. Sobald PI gebunden hat, erhöht sich dessen Fluoreszenz um das 20- bis 30-fache und kann unter dem Mikroskop (Axio Observer D1, Carl Zeiss, Berlin) detektiert werden.

Zum Nachweis der Elektroporation wurde das Medium auf den Zellen vor und 5, 10 und 15 min nach der Behandlung mit nsPEF gegen mit 1 mM PI versetztem Medium ausgetauscht und die Zellen für 10 min inkubiert. Anschließend wurde die Fluoreszenz unter dem Mikroskop betrachtet und mit einer unbehandelten Kontrolle verglichen.

2.6 Nachweis der Zell-Zell-Kommunikation mittels Fluoreszenzfarbstoff Transfer-Assay

Um ZZK im Monolayer sichtbar zu machen, wurde ein Fluoreszenzfarbstoff-Transfer Assay durchgeführt (Abb. 2.3) [139]. Nach der Behandlung mit nsPEFs wurden die Zellen unterschiedlich lange inkubiert (Abb. 2.3 (1)), bevor das Medium entfernt und durch einen Farbstoff-Mix, bestehend aus 0,05 % Lucifer Yellow (LY) (L0259, Sigma-Aldrich, Taufkirchen) und 0,1 % Dextran-konjugiertem Texas Red (TR) (D-1828, Invitrogen, Darmstadt) in PBS, ersetzt wurde. Mittels einer Rasierklinge wurde ein feiner Schnitt („Kratzer“) in den Monolayer gesetzt und die Zellen anschließend für 3 min inkubiert (Abb. 2.3 (2)). In dieser Zeit nehmen die verletzten Zellen entlang des Kratzers den Farbstoff-Mix auf.

Sind die Zellen über funktionierende und geöffnete GJs miteinander verbunden, kann das niedermolekulare LY (457,25 Da) von den beschädigten Zellen in angrenzende Zellen diffundieren, während das an Dextran (10.000 Da) gekoppelte TR nicht GJ-permeabel ist und in der verletzten Zelle verbleibt (Abb. 2.3 (3)). Nach der Inkubationszeit wurde der Monolayer 3-mal mit DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Salt Solution with Ca and Mg, Pan Biotech, Aidenbach) gewaschen, anschließend mit 4 % Paraformaldehyd (PFA) in PBS fixiert und unter einem Fluoreszenz-Mikroskop (Axio Observer D1, Carl Zeiss, Berlin) fotografiert.

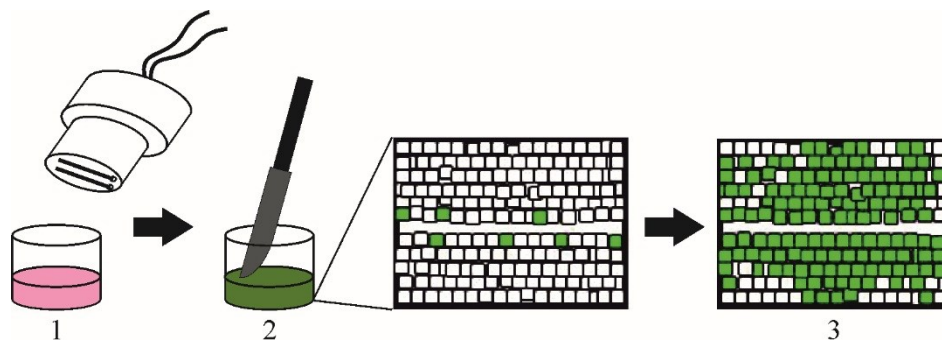


Abb. 2.3 Schematische Darstellung des Fluoreszenzfarbstoff-Transfer Assays: Nach der Behandlung der Zellen mit nsPEFs (1) wird das Medium gegen eine Fluoreszenzfarbstoff-Mischung, bestehend aus dem GJ-permeablen Lucifer Yellow und dem GJ-impermeablen Texas Red, ausgetauscht und ein Kratzer in den Monolayer gemacht (2). Die verletzten Zellen entlang des Schnitts nehmen den Farbstoff auf, der dann über funktionsfähige GJs in benachbarte Zellen diffundieren kann (3).

Pro Well wurden 3-5 Bilder aufgenommen und beide Fluoreszenzkanäle getrennt mittels MatLab (The MathWorks, Natick, MA) ausgewertet. Die Aufnahmen wurden zunächst in Schwarz/Weiß Bilder konvertiert und anschließend der fluoreszierende Anteil in Prozent für jede Aufnahme ermittelt. Die Fluoreszenz des TR-Kanals ergab einen Mittelwert von 5 % und entspricht der Zahl der Zellen im Beobachtungsfeld, die durch den Kratzer verletzt wurden und dadurch den Farbstoff-Mix aufgenommen haben. Dieser Basiswert wurde von dem Fluoreszenzsignal des LY-Kanals abgezogen, um nur den Anteil der über GJs kommunizierenden Zellen zu bestimmen.

2.7 Nachweis von Cx43, F-Aktin und ZO-1 mittels Immunfluoreszenz

Die Cx43-Verteilung in den Zellen sowie das Aktin-Zytoskelett wurden mittels Immunfluoreszenz sichtbar gemacht. Dazu wurde in jedes Well einer 12-Well Platte ein Deckglas

gelegt und Zellen darauf ausgesät. Nachdem sich ein konfluent Monolayer gebildet hatte, wurden die Zellen mit nsPEFs behandelt. Nach festgelegten Inkubationszeiten wurden die Zellen auf den Deckgläsern einmal mit PBS gewaschen, danach für 15 min mit 4 % PFA fixiert und anschließend für 20 min mit 0,25 % Triton-X-100 in PBS permeabilisiert. Nach zweimaligem Waschen mit deionisiertem Wasser wurden die Zellen mit dem Cx43-Primärantikörper (Cell Signaling #3512, Frankfurt am Main, 1:75 in 1 % BSA/PBS) und FITC-Phalloidin (Fluorescein Isothiocyanate Labeled Phalloidin, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, 1:200, Färbung von F-Aktin) bei 4 °C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, bevor sie mit dem Sekundärantikörper anti-rabbit Alexa Fluor 546 (A-11035, Life Technologies, Darmstadt, 1:1000) und Hoechst 33342 (1:500) in PBS für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Anschließend wurden die Zellen noch zweimal mit PBS gewaschen und die Deckgläser danach mit Fluoromount (Sigma Aldrich, Traunstein) auf Objektträger eingebettet. Bis zur Untersuchung der Zellen mit einem konfokalen Mikroskop (TCS SP5, Leica, Wetzlar) wurden die Proben bei 4 °C gelagert.

Auf die gleiche Weise wie das Cx43 wurde auch das Tight Junction Protein ZO-1 detektiert (rabbit-anti-ZO-1, QA213066, Life Technologies, Darmstadt, 1:100 in 1 % BSA/PBS), allerdings ohne die gleichzeitige Färbung von F-Aktin und unter Verwendung eines normalen Fluoreszenz-Mikroskops (Axio Observer D1, Carl Zeiss, Berlin).

2.8 Analyse der Genexpression

Für die Analyse der Genexpression von Cx43 wurden Zellen in 12-Well Platten ausgesät und nach Erreichen eines konfluenten Monolayers jeweils 12 Wells mit dem gleichen Parametersatz behandelt. Nach festgelegten Inkubationszeiten wurden nur die Zellen aus dem Bereich zwischen den Elektroden abgeschabt und in eisgekühltem PBS aufgenommen, anschließend für 8 min bei 12.000 rpm und 4 °C zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Pellet bis zur Weiterverwendung bei -20 °C eingefroren.

2.8.1 Isolierung der RNA

Zur Isolierung der Gesamt-RNA wurde der RNA MiniKit (Bio&Sell, Feucht) verwendet. Die Isolierung wurde entsprechend der Herstellervorschrift durchgeführt und die RNA-Konzentration mittels eines Spektralphotometers (NanoDrop 2000/2000C, Thermo Scientific Inc., Waltham (MA), USA) bestimmt.

2.8.2 Transkription der cDNA

Nach der Isolierung der RNA und Bestimmung der RNA-Konzentration wurde 1 µg RNA unter Verwendung des Transcriptor First Strand Synthesis Kit (Hofmann-La Roche AG, Basel, CH) nach Herstellervorschrift in cDNA transkribiert. Für die Polymerase Kettenreaktion (PCR) wurden Oligo dT-Primer (1 µl (100 µM)) eingesetzt und mit 1 µg RNA für 10 min bei 65°C inkubiert. Anschließend wurde der Mastermix (2 µl (10 mM) dNTP's, 0,5 µl (40 U/µl) RNAsin, 4 µl PCR-Puffer (5-fach) und 0,5 µl (20 U/µl) reverser Transkriptase) zum Ansatz zugefügt. Im nächsten Schritt wurde der Ansatz für die Transkription für 30 min auf 50 °C erhitzt, anschließend die reverse Transkriptase 5 min bei 85 °C inaktiviert und die cDNA-Konzentration mithilfe des NanoDrop-Spektralphotometers bestimmt.

2.8.3 Quantitative Real-Time Polymerase-Kettenreaktion

Für die quantitative Real-Time PCR (qPCR) wurde der RealTime ready Catalog assay GAJ1 bzw. RPL13A (Hofmann-La Roche AG, Basel, CH) verwendet. Im ersten Schritt wurde ein Mastermix aus 4 µl PCR-Wasser, 10 µl LightCycler® 480 Probes Master und je 1 µl (8 pmol) des entsprechenden Primerpaares für Cx43 bzw. RPL13A hergestellt und jeweils 15 µl Mastermix in einer PCR-96-Well-Platte vorgelegt. Im Anschluss wurden 5 µl (100 ng) der spezifischen cDNA hinzugegeben. Für die Durchführung der qPCR wurde der LightCycler® 480 (Hofmann-La Roche AG, Basel, CH) mit dem in Tab. 2.1 beschriebenen Programm verwendet.

Die Auswertung der qPCR Ergebnisse basierte auf den CP-Werten², die mit der LightCycler® 480 Software berechnet wurden. Die normalisierten Werte wurden nach folgender Formel bestimmt:

$$\text{normalisierter Ratio} = \frac{\frac{CP \text{ Zielgen}}{CP \text{ Referenzgen (RPL13A)}}}{\frac{CP \text{ Zielgen}}{CP \text{ Referenzgen (RPL13A)}}} \quad \begin{array}{l} \text{Probe} \\ \text{Kalibrator (Ktrl)} \end{array} \quad (2.3)$$

Die Berechnung der prozentualen Veränderungen der mRNA-Expression erfolgte mit folgender Formel:

² „Crossing Point“ (CP)-Werte: entsprechen der Anzahl der PCR-Zyklen die nötig sind, um ein konstant und zuvor definiertes Fluoreszenzniveau zu erreichen

$$\Delta (mRNA - Expression) \% = 100 \% - \left(\frac{100 \% \cdot \text{normalisierter Ratio (Probe)}}{\text{normalisierter Ratio (Kontrolle)}} \right) \quad (2.4)$$

Tab. 2.1: Zyklusprogramm qRT-PCR

Programm	Analysenmodus	Zieltemperatur	Zeit (hh:mm:ss)
Prä-Inkubation (1 Zyklus)	-	95°C	00:10:00
Amplifikation (45 Zyklen)	-	95°C	00:00:10
	-	60°C	00:00:30
	Quantifizierung	72°C	00:00:01
Kühlung (1 Zyklus)	-	40°C	00:00:30

2.9 Proteinanalyse

Für die Proteinanalyse wurden die Proben wie in Abschnitt 2.8 beschrieben vorbereitet. Das so erhaltene Zell-Pellet wurde in 60 µl Lyse-Puffer (50 mM Tris, 10 mM EDTA, 1 % SDS) resuspendiert, mit Ultraschall (6 Pulse, Amplitude 50 %, Zyklus 0,6) behandelt und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Proben für 8 min bei 4 °C und 9000 rpm zentrifugiert, der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bis zur Weiterverwendung bei -80 °C eingefroren.

2.9.1 Bestimmung der Proteinkonzentrationen

Die Bestimmung der Proteinkonzentrationen erfolgte in Triplikaten mithilfe des DC™ Assay (BioRad, Hercules (CA), USA) nach Herstellervorschrift, unter Verwendung einer BSA-Standardkurve.

2.9.2 Western Blot

Die Proben zur Untersuchung der MAP-Kinase-Aktivität wurden für 5 min auf 95 °C erhitzt und die Proben zur Cx43 Bestimmung für 1 h bei 37 °C inkubiert. Jeweils 30 µl Probe wurden auf Criterion™ TGX Stain-Free™ Precast Gels (Bio-Rad, Hercules, CA) geladen. Nach der Gelelektrophorese wurden die Gele durch UV-Licht aktiviert und mit dem Image-Quant LAS 4000 (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK) abgebildet.

Die PVDF-Membranen (Bio-Rad) wurden für 30 s in Ethanol (96 %) equilibriert, bevor die separierten Proteine mit dem Trans-Blot Turbo Transfer System auf die Membranen geblottet und mit dem ImageQuant LAS 4000 abgebildet wurden. Die Membranen wurden für 1 h in TBST mit 5 % Milchpulver geblockt. Nachdem die Membranen mit TBST gewaschen wurden, wurden sie über Nacht mit dem primären Antikörper (1:1000 in TBST) bei 4 °C und anschließend für 1 h bei Raumtemperatur mit dem sekundären HRP-konjugierten Antikörper (goat anti-rabbit, 1:10.000 in TBST, Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) inkubiert. Folgende Primärantikörper wurden verwendet (alle von New England Biolabs, Ipswich, MA): Cx43 (#3512), p38 (#8690), p38 phosphoryliert (#4511), Erk 1/2 (#9102), Erk 1/2 phosphoryliert (#4370).

Die Membranen zur Analyse der MAP-Kinasen wurden zweimal verwendet, zunächst zur Detektion der phosphorylierten und anschließend der unphosphorylierten Form. Dazu wurden die Membranen für 25 min bei 70 °C mit einer Stripping-Lösung (62,5 mM Tris, 1 % SDS, 100 mM β -mercaptoethanol, pH-Wert 6.7) inkubiert. Da der Cx43-Antikörper auch die phosphorylierte Form bindet, wurde hier kein zweiter Antikörper benötigt.

Für die Detektion der Zielproteine wurde Amersham ECL Select (GE Healthcare) entsprechend der Herstellervorschriften verwendet. Die Chemilumineszenz-Signale wurden mit dem ImageQuant LAS 4000 detektiert. Die Blots wurden mithilfe der ImageQuant TL Software (GE Healthcare) ausgewertet.

2.10 Statistik

Zur Auswertung des Fluoreszenzfarbstoff-Transfer Assay sowie der qPCR und Western Blot Daten wurden mindestens 3 unabhängige Versuche je untersuchter Feldstärke und Zeitpunkt durchgeführt. Die Signifikanzen wurden mittels one-way ANOVA-Dunnett's Test berechnet, mit Signifikanzwerten von $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**) und $p < 0.001$ (***).

2.11 Rasterkraftmikroskopie

2.11.1 Aufbau und Funktionsweise

Die Rasterkraftmikroskopie (AFM, engl. *atomic force microscopy*) bietet die Möglichkeit Oberflächen zerstörungsfrei mit atomarer Auflösung abzubilden oder auch die mechani-

schen Eigenschaften einer Probe zu bestimmen [140]. Der Aufbau eines Rasterkraftmikroskops ist schematisch in Abb. 2.4 gezeigt. Die Probenoberfläche wird von einer sehr feinen Spitze mit einem Spitzenradius im Nanometer-Bereich gerastert, die sich an der Unterseite eines Federbalkens (Cantilever) befindet, der wiederum an einer Piezokeramik befestigt ist. Aufgrund der Oberflächenbeschaffenheit, wie Höhenänderungen bzw. atomaren Wechselwirkungskräften zwischen Probe und Spitze, wird der Cantilever positionsabhängig unterschiedlich weit gebogen. Die Änderungen der Auslenkungen werden mithilfe eines Laserstrahls detektiert, der vom Cantilever reflektiert wird und auf eine segmentierte Photodiode trifft. Im angeschlossenen Steuercomputer wird aus den Daten ein Bild der Probe rekonstruiert.

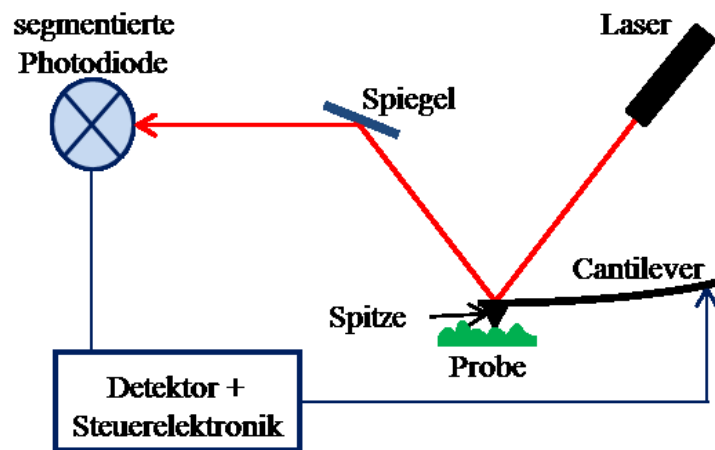


Abb. 2.4 Schematische Darstellung der Funktionsweise eines Rasterkraftmikroskops. Die Cantileverspitze rastert mit einer definierten Kraft die Probenoberfläche ab. Die dadurch entstehenden Verbiegungen des Cantilevers werden mithilfe eines Laserstrahls detektiert, der auf eine segmentierte Photodiode trifft. Die Daten werden über einen Computer zu einem Bild zusammengesetzt.

Das AFM kann zur Bildgebung in verschiedenen Messmodi betrieben werden. Im Kontaktmodus, der vor allem für die Abbildung von harten Materialien geeignet ist, wird der Cantilever mit einer konstanten Kraft auf die Probenoberfläche gedrückt. Höhenänderungen werden durch die Verbiegung des Cantilevers detektiert und die Kraft anschließend über den Piezoscanner nachgeregt. Dieser Messmodus ist für biologische Proben eher ungeeignet, da die permanent ausgeübte Kraft bei Zellen zu einer irreversiblen Deformation führen kann. Im *tapping*-Modus wird der Cantilever zu einer konstanten Schwingung in seiner Resonanzfrequenz angeregt. In der Nähe der Probe wird die Schwingungsamplitude gedämpft. Diese Dämpfung wird detektiert und durch die Anpassung des Abstandes zwischen Cantileverspitze und Probe ausgeglichen. So kann die Probenoberfläche fast ohne

Reibungskräfte untersucht werden und die Methode ist damit auch für biologische Proben geeignet [141].

2.11.2 Kraft-Abstands-Kurven und Bestimmung der Elastizitätsmoduln

Neben der Oberflächentopographie können mit dem AFM auch lokal Kräfte gemessen und so die mechanischen Eigenschaften von Proben untersucht werden [142]. Dazu werden Kraft-Abstands-Kurven aufgenommen.

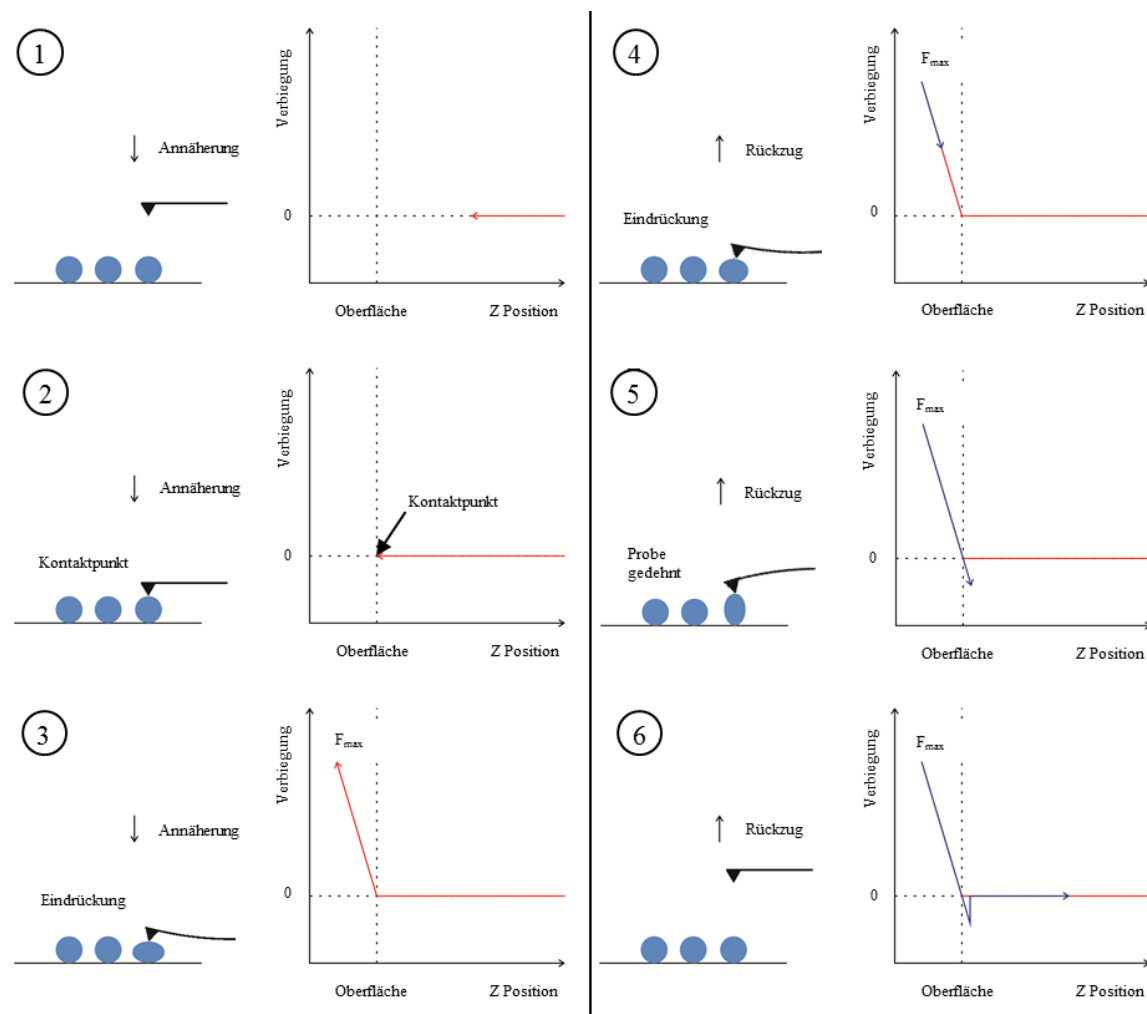


Abb. 2.5 Theoretischer Ablauf der Aufzeichnung einer Kraft-Abstands-Kurve: 1) Annäherung des Cantilevers an die Probe; 2) der Cantilever berührt die Probe (Kontaktpunkt); 3) der Cantilever wird in die Probe eingedrückt; 4) der Cantilever wird zurückgezogen; 5) die Probe wird gedehnt; 6) Rückzug des Cantilevers

Während der Annäherung des Cantilevers an die Probe wirkt keine Kraft auf den Cantilever und er wird somit auch nicht verbogen. Die aufgenommene Kurve zeigt eine Nulllinie (Abb. 2.5 (1)). Wird der Cantilever, nachdem die AFM-Spitze die Oberfläche berührt hat

(Abb. 2.5 (2)), weiter nach unten gedrückt, steigt die auf den Cantilever wirkende Kraft, was zu einem Verbiegen des Cantilevers und einem Anstieg der Kraft-Abstands-Kurve führt (Abb. 2.5 (3)). Erreicht die Kraft den Wert der zuvor definierten Maximal-Kraft (F_{\max}), wird der Cantilever wieder von der Probe entfernt. Das aufgenommene Kraft-Abstands-Verhalten entspricht auf dem Rückweg bis zum Kontaktpunkt theoretisch dem der Annäherung (Abb. 2.5 (4)). Wird der Cantilever weiter von der Probe entfernt, kann es zur Dehnung der Probe kommen, wobei sich der Cantilever in die entgegengesetzte Richtung biegt. Dies resultiert in einem Negativ-Peak der Kraft-Abstands-Kurve (Abb. 2.5 (5)). Nachdem sich die Spitze von der Probe gelöst hat, wirkt keine Kraft mehr auf den Cantilever und die Kurve zeigt wieder eine Nulllinie an (Abb. 2.5 (6)).

Bei sehr geringen Abständen zwischen AFM-Spitze und Probenoberfläche kann es zu atomaren Wechselwirkungskräften, wie z.B. Coulomb-, van-der-Waals oder elektrostatischen Kräften, kommen. Dies führt bei der Annäherung des Cantilevers an die Probe zum sogenannten „*snap-on*“-Effekt, d.h. die AFM-Spitze „springt“ an die Probenoberfläche, obwohl sich der Cantilever noch oberhalb der Probe befindet. Dadurch verbiegt sich der Cantilever in die „negative“ Richtung, was in der Kraft-Abstands-Kurve in einem Peak unterhalb der Nulllinie resultiert, ähnlich wie bei der Dehnung der Probe während des Rückzugs des Cantilevers (Abb. 2.5 (5)).

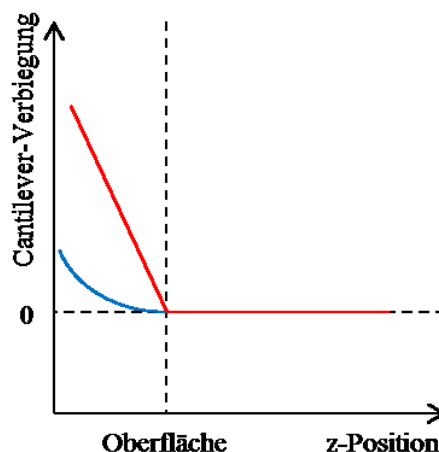


Abb. 2.6 Vergleich von Kraft-Abstands-Kurven von unterschiedlich harten Proben. Bei einer harten Probe ist die Verbiegung des Cantilevers proportional zur Kraft (rot). Eine weiche Probe hingegen, wie z.B. eine Zelle, zeigt ein elastisches Verhalten, da die AFM-Spitze zunächst in die Probe eingedrückt wird und die Verbiegung erst mit steigender Kompression der Probe zunimmt (blau).

Je nach Elastizität der Probe ergeben sich für die Kraft-Abstands-Kurven unterschiedliche Verläufe (Abb. 2.6). Trifft der Cantilever auf eine harte Oberfläche, ist die Verbiegung proportional zur applizierten Kraft und resultiert in einem linearen Anstieg der Kurve (Abb. 2.6, rote Kurve). Weiche Proben hingegen, wie z.B. Zellen, zeigen ein elasto-plastisches Verhalten [143]. Während der Messung wird die Oberfläche eingedrückt und die Kurve weist einen nicht-linearen Verlauf auf (Abb. 2.6, blaue Kurve). Bei dünnen Proben, wie beispielsweise einer adhären, ausgebreiteten Zelle, kann zudem die Substratoberfläche die Messung bei tieferem Eindringen der AFM-Spitze beeinflussen.

Zum Aufnehmen der Kraft-Abstands-Kurven wurden die Zellen wie in Kap. 2.1 beschrieben kultiviert und in 35 mm-Petrischalen vorbereitet. Vor jeder Messung wurde das Medium auf den Zellen gegen auf 37 °C erwärmtes DMEM (1 g/l Glukose), versetzt mit 25 mM HEPES, ausgetauscht. Anschließend wurden die Schalen unter das AFM (Nanowizard 3 BioScience, JPK Instruments, Berlin, Germany) und in den PetriDishHeater (JPK) bei 37 °C gestellt.

Das AFM wurde für die Messungen im Kontaktmodus betrieben. Es wurden 64 x 64, also insgesamt 4096 Kraftkurven über eine Fläche von 30 x 30 μm^2 aufgenommen. Dazu wurde der QITM (Quantitative Imaging) Modus von JPK genutzt. Die maximal applizierte Kraft betrug 4 nN bei einer z-Länge von 3 μm und einer Frequenz von 50 kHz. Es wurden handelsübliche Siliziumnitrid-Cantilever (MLCT, Bruker, Camarillo, CA) mit einer nominalen Federkonstanten von 0,03 N/m, einem Spitzenradius von 20 nm und einem Frontwinkel von 15 ° verwendet. Vor jedem Experiment wurde die Federkonstante des Cantilevers mittels Thermal Noise Methode neu bestimmt [144].

Die Berechnung der Elastizitätsmoduln der Zellen basiert auf dem Hertz-Modell, das die Deformation zweier linear elastischer, kugelförmiger Körper beschreibt, die aufeinander gepresst werden. Weitere wichtige Annahmen sind, dass es zwischen den beiden Körpern keine weiteren Wechselwirkungen gibt und ihre Kontaktflächen im Vergleich zu den Körpern klein sind [145]. Dieses Modell wurde von Sneddon auf andere Geometrien übertragen, wodurch es sich auch auf einen Cantilever mit einer vierseitigen Pyramide als Spitze anwenden lässt [146].

Die Elastizitätsmoduln wurden unter Verwendung der Data Processing Software von JPK bestimmt [147]. Die materialabhängige Poissonzahl μ , die das elastische Verhalten eines Körpers beschreibt, wurde mit 0,5 angegeben, obwohl sie über der Zelle variieren kann [142]. Zudem wurde für die vorliegende Arbeit eine Eindringtiefe der Cantileverspitze von

300 nm gewählt, da zum einen so ein Einfluss der Substratoberfläche auf die Messung vermieden und die Zelle nicht verletzt werden sollte. Zum anderen sollte die allgemeine Elastizität der Zelle ermittelt werden und nicht nur die Elastizität der zytoskelettalen Strukturen direkt unter der Membran.

Die so bestimmten Werte für die Elastizitätsmoduln wurden mithilfe der OriginPro 8 Software (OriginLab Corporation, Northampton, MA) in ein Histogramm aufgetragen und anschließend mit einer Gauß-Kurve gefittet. Die Gauß-Kurve beschreibt eine Normalverteilung eines Datensatzes und hat den Vorteil, dass „Ausreißer“ kaum einen Einfluss auf die Werte haben. Für die weitere Auswertung wurden die den Gauß-Kurven zugehörigen Peak-Werte ermittelt. Aus den Halbwertsbreiten der Gauß-Kurven (FWHM) wurden mithilfe der folgenden Formel die Standardabweichungen (SD) berechnet:

$$FWHM = 2\sqrt{2 \ln 2} \cdot SD \approx 2,3548 \cdot SD \quad (2.5)$$

Die statistische Auswertung der Ergebnisse wurde mit den Peak-Werten der Gauß-Kurven sowie den aus den Halbwertsbreiten ermittelten Standardabweichungen vorgenommen.

2.12 Scratch Assay

Der Scratch Assay dient zur Bestimmung der Zellmigration und -proliferation *in vitro*. Dazu wurde nach der Behandlung mit nsPEFs mithilfe einer Pipettenspitze ein Kratzer in den konfluenten Monolayer eingebracht, der eine Breite von ca. 600 µm hatte. Der Kratzer wurde im rechten Winkel zu den Elektrodenpositionen eingebracht. Direkt im Anschluss wurde das Medium durch frisches Medium ersetzt, um tote und abgelöste Zellen wegzuspülen. Die Zellkulturschalen wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ für 24 h unter einem Mikroskop (Axiovert 40 CFL, Zeiss, Oberkochen, Germany) inkubiert. Während dieser Zeit wurde alle 5 min ein Bild aufgenommen [148].

Die Bilder wurden mithilfe der ZEN Software (*blue edition*, Carl Zeiss MicroImaging GmbH) ausgewertet. Dazu wurde bei jeder 30. Aufnahme, was einer Zeitspanne von 2,5 h entspricht, jeweils an drei unterschiedlichen Stellen die Breite des Kratzers ausgemessen und gegen die ursprüngliche Breite des Kratzers zu Beginn des Versuchs normiert. Der prozentuale Anteil des zugewachsenen Spaltes von mit Hochspannungspulsen behandelten WB-F344 Zellen wurde mit denen von unbehandelten WB-F344 und WB-ras Zellen verglichen.

2.13 Soft Agar Colony Formation Assay

Der Soft Agar Colony Formation Assay ist ein semi-quantitativer *in vitro* Test auf zelluläre Transformation, die durch Chemikalien oder andere Mechanismen ausgelöst wurde. Normale Zellen brauchen einen festen Untergrund, um sich teilen zu können, während transformierte Zellen auch verankerungsunabhängig in einem viskosen Gel, wie z.B. Agar, wachsen können. Es wird angenommen, dass der Transformations-Prozess, bei dem sich die Zellen phänotypisch verändern, stark mit der Karzinogenese *in vivo* korreliert. Somit gibt dieser Assay einen ersten Hinweis auf eine mögliche maligne Transformation der Zellen [149].

Für den Assay wurde Agarose (GTQ, Carl Roth, Karlsruhe) in Vollmedium erhitzt und aufgelöst. Je 1 ml 1 %-ige Agarose wurde in die Wells einer 6-Well Platte gefüllt und abkühlen gelassen. Anschließend wurden die Zellen wie in Kap. 2.1 beschrieben abgelöst und in *pulsing*-Puffer (2,5 mM KH_2PO_4 , 10 mM K_2HPO_4 , 125 mM Saccarose, 2 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) resuspendiert. Die Behandlung der Zellen mit nsPEFs erfolgte in Elektroporationsküvetten (VWR International GmbH, Darmstadt) mit einem Elektrodenabstand von 4 mm. Für die Behandlung wurden 800 μl der Zellsuspension in eine Küvette überführt, die Küvette in eine selbst konzipierte Halterung gestellt und darin die elektrischen Pulse appliziert. Direkt im Anschluss wurden 100 μl der Suspension, die ca. 5000 Zellen enthielten, mit 1 ml 0,33 %-iger Agarose vermischt und auf die bereits vorhandene Agaroseschicht in den Wells gegeben. Bei diesem kritischen Schritt musste auf die Temperatur der Agarose geachtet werden, die zwischen 30 und 40 °C liegen sollte, da die Zellen bei zu hohen Temperaturen absterben. Bei niedrigen Temperaturen wird die Agarose fest und lässt sich nicht mehr im Well verteilen. Zum Abschluss folgte noch eine Schicht aus 1 ml 0,5 %-iger Agarose. Als Negativ- bzw. Positivkontrolle dienten unbehandelte WB-F344 bzw. WB-ras Zellen.

Die Platten wurden im Brutschrank inkubiert und zweimal pro Woche mit 0,5 ml Medium je Well versorgt. Nach drei Wochen wurden die Zellen bzw. Kolonien mit einer 1:1-Mischung aus Giemsa (Carl Roth) und Methanol gefärbt und unter dem Mikroskop detektiert [150].

3 Ergebnisse

3.1 Erzeugung eines 100 ns-Pulses

Die zur Erzeugung der gepulsten elektrischen Felder nötigen Hochspannungspulse wurden von einem Wellenleitungspulsgenerator in einer Blumlein-Konfiguration bereitgestellt (s. Kap. 2.2). Ein mit einem digitalen Speicheroszilloskop aufgenommener typischer über dem Monolayer angelegter Spannungspuls ist in Abb. 3.1 gezeigt. Die generierten Rechteckpulse wiesen eine Länge von 100 ns mit einer relativ kurzen Anstiegszeit von ca. 13 ns auf. Die Amplitude entsprach in etwa der Ladespannung des Pulsgenerators.

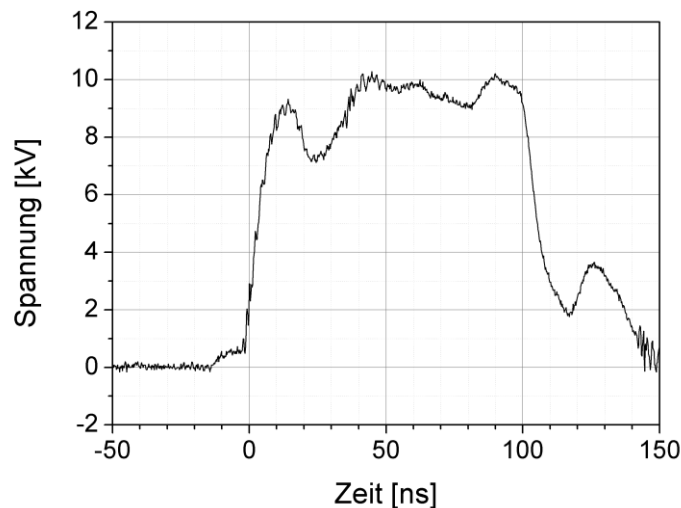


Abb. 3.1 Aufnahme eines mit dem Blumlein-Pulsgenerator erzeugten Rechteckpulses mit einer Länge von 100 ns und einer Amplitude von 10 kV. Der Puls wurde in Vollmedium appliziert und mit einem digitalen Speicheroszilloskop aufgezeichnet.

Nimmt man den Spannungsverlauf über einen längeren Zeitraum auf, erkennt man, dass außer dem gewünschten Puls auch Reflektionen des Pulses auftreten (Abb. 3.2). Das liegt daran, dass der Widerstand der Probe (Z_{Probe}), in diesem Fall also der des Mediums, etwas geringer ist als die Impedanz des Blumlein-Pulsgenerators ($2Z_{\text{Kabel}}$).

Beim Schließen des Schalters S wird eine Wanderwelle ausgelöst, die sich in Richtung Probe ausbreitet. Bei einer Änderung der Impedanz entlang der Ausbreitungsrichtung, also wenn $2Z_{\text{Kabel}} \neq Z_{\text{Probe}}$, wird nur ein Teil der Welle durch die Probe durchgelassen und ein Teil reflektiert. Entspricht $2Z_{\text{Kabel}} = Z_{\text{Probe}}$ überlagern sich die Wellen an der Last zu einem

rechteckigen Spannungspuls, dessen Länge durch die Länge der Kabel bestimmt wird. Neben der Amplitude können die Reflektionen auch die Form des Pulses verändern [151].

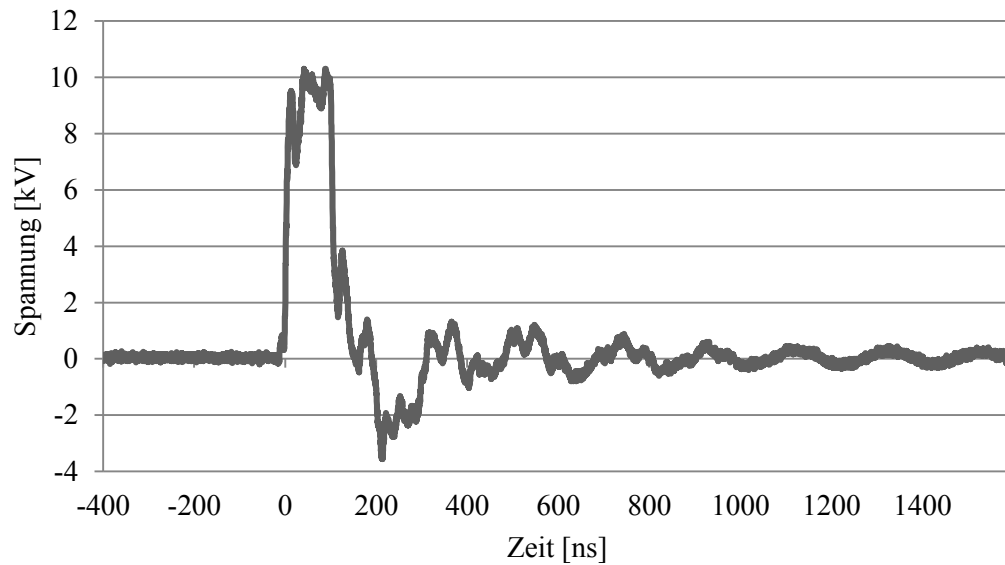


Abb. 3.2 Oszillationen der Spannungsamplitude am Ende des mit dem Blumlein-Pulsgenerator erzeugten Pulses, der in Vollmedium appliziert wurde.

3.2 Simulation der elektrischen Feldstärkeverteilung

Da die Zellen im Monolayer einem elektrischen Feld ausgesetzt wurden, das zwischen zwei Drahtelektroden erzeugt wurde, kann nicht davon ausgegangen werden, dass das elektrische Feld im Behandlungsbereich homogen ist und sich aus der angelegten Spannung und dem Elektrodenabstand berechnen lässt. Zudem lagen die Elektroden auf dem Monolayer auf bzw. waren in diesen eingedrückt. Um über die Feldverteilung Aufschluss zu erlangen, insbesondere im Monolayer, wurde das elektrische Feld mit der EStat Software (Field Precision LLC, Albuquerque, NM) simuliert. Abb. 3.3a zeigt die farbcodierte Simulation der Feldstärkeverteilung für in wässriger Umgebung applizierte Spannungen. Dazu wurde eine Spannung von 10 kV bei einem Elektrodenabstand von 5 mm und einer relativen Permittivität von 80 für Wasser bzw. von 2 für das Substrat angenommen.

In Abb. 3.3b ist grafisch der Querschnitt durch die elektrische Feldverteilung auf Höhe der Substratoberfläche abgebildet. Die Simulation zeigt, dass das elektrische Feld in der Nähe der Elektroden auf Substrathöhe annähernd verschwindet und die Feldstärke dann in einer Entfernung von ca. 0,5 mm steil auf einen Wert von ungefähr 24 kV/cm ansteigt. In der Mitte zwischen den Elektroden, bei einem Abstand von etwa 1,5 mm zu beiden Elektroden, fällt die Feldstärke wieder um ungefähr 8 % auf einen Wert von ca. 22 kV/cm ab und bleibt

3 Ergebnisse

dort annähernd konstant. Insgesamt ist der Monolayer zwischen den Elektroden damit einem Feld ausgesetzt, das über die Fläche in der Stärke mit 23 kV/cm beschrieben werden kann, mit einer Abweichung von ± 1 kV/cm (etwa 4 %).

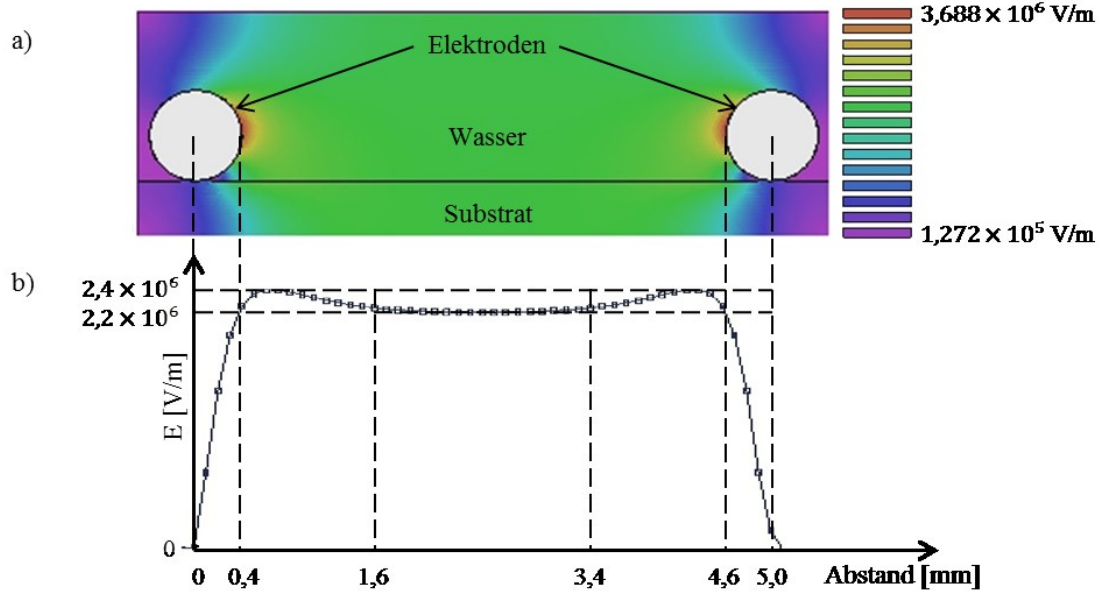


Abb. 3.3 a) Farbcodierte Simulation der elektrischen Feldstärkeverteilung zwischen zwei zylinderförmigen Drahtelektroden (Durchmesser 0,8 mm) für in Wasser applizierte Spannungen, für folgende Parameter: Elektrodenabstand $d=5$ mm, angelegte Spannung $V_0=10$ kV, rel. Permittivität Wasser $\epsilon_{\text{Wasser}}=80$, rel. Permittivität Polystyrol $\epsilon_{\text{Substrat}}=2$. b) Grafische Darstellung der elektrischen Feldstärkeverteilung entlang der Oberfläche des Substrats, auf der die Zellen adhärirt sind.

3.3 Zellvitalität und Elektroporation

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, subletale Effekte von nsPEFs auf Zellen zu untersuchen. Deshalb wurde zu Beginn ein MTT-Test durchgeführt, mit dem das Überleben der Zellen in Abhängigkeit von den Behandlungsparametern bestimmt und entsprechend der Parameterraum für die Untersuchungen eingeschränkt wurde. Die violette Farbe repräsentiert die Enzymaktivität und somit vitale Zellen, während die hellen Bereiche im Well auf einen reduzierten Stoffwechsel und somit auf tote Zellen hinweisen (Abb. 3.4). Nach der Inkubation der Zellen mit der MTT-Lösung und noch vor der Lyse der Zellen ist vor allem für höhere Feldstärken klar erkennbar, dass das elektrische Feld nur auf die Zellen zwischen den Elektroden wirkt (Abb. 3.4c, d). Mit steigender Feldstärke steigt auch der Anteil der nicht-gefärbten Fläche, also der abgestorbenen Zellen.

Neben der Vitalität der Zellen nach der Behandlung mit nsPEFs wurde auch eine Scheinbehandlung durchgeführt, um ein Absterben der Zellen aufgrund des Einbringens der Elek-

troden in das Well auszuschließen. Dazu wurden die Elektroden wie zum Applizieren der Pulse auf die Zellen gesetzt, jedoch ohne die Spannungsquelle einzuschalten und für ca. 20 s, also in etwa so lange, wie die Behandlung mit 20 Pulsen dauert, auf den Zellen belassen.

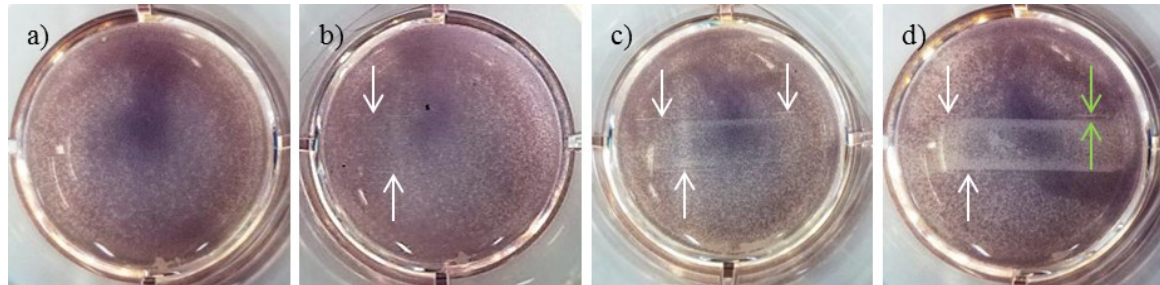


Abb. 3.4 MTT-Test eines unbehandelten WB-F344 Monolayers (a), bzw. nach dem Applizieren von 20 Pulsen mit 5, 15 und 25 kV/cm (b-d). Die Fotos wurden vor dem Lysieren der Zellen aufgenommen. Die weißen Pfeile deuten auf die Stellen, wo zuvor die Elektroden positioniert waren. Die grünen Pfeile grenzen den Bereich zwischen der vorherigen Elektrodenposition und dem Bereich ein, ab dem das elektrische Feld einen Effekt auf die Zellen hat.

Bei den Zellen, die mit einer höheren Feldstärke behandelt wurden (Abb. 3.4c, d), ist zwischen der vorherigen Elektrodenposition (weiße Pfeile) und dem Bereich, in dem die Zellen aufgrund der Behandlung mit nsPEFs abgestorben waren, ein sehr schmaler, violetter Streifen zu erkennen (grüne Pfeile), in dem die Zellen offensichtlich überlebt haben. Das elektrische Feld scheint nicht sofort ab dem Punkt, an dem die Elektroden das Substrat berührt hatten, auf die Zellen gewirkt zu haben, was sehr gut mit der simulierten Feldstärkeverteilung übereinstimmt.

Abb. 3.5 zeigt die Ergebnisse des MTT-Tests für WB-F344 und WB-ras Zellen, die mit 20 Pulsen mit einer Länge von 100 ns und Feldstärken zwischen 5 und 35 kV/cm behandelt wurden. Die beiden Zelllinien weisen eine unterschiedliche Sensitivität gegenüber nsPEFs auf. Die Enzymaktivität der normalen Zellen bleibt bis zu einer Feldstärke von 15 kV/cm weitestgehend konstant und sinkt erst nach einer Behandlung mit 20 kV/cm auf einen Wert von 88 % im Vergleich zur Kontrolle ab. Für höhere Feldstärken sinkt die Zellvitalität kontinuierlich von 77 % für eine applizierte Feldstärke von 25 kV/cm auf ungefähr 27 % für 35 kV/cm. Im Vergleich dazu schwankten die Werte der tumorigenen Zelllinie WB-ras für alle applizierten Feldstärken um den Wert der Kontrolle.

Die Ergebnisse dieser Messung sind mit relativ großen Fehlern behaftet. Das liegt zum einen daran, dass nur die Vitalität der behandelten Zellen, also der Zellen zwischen den

3 Ergebnisse

Elektroden, untersucht werden sollte. Für die Messung im Plattenreader wurden aber alle Zellen im Well lysiert. Zum anderen konnten sich während des Spülens der Zellen teilweise kleine Bereiche des Monolayers ablösen, die dann mit der Spülflüssigkeit abgesaugt wurden und somit die Absorptionswerte beeinflusst haben. Die Ergebnisse des MTT-Tests zeigten, dass die WB-ras unempfindlicher gegenüber nsPEFs waren, weshalb die mit den WB-F344 Zellen erzielten Resultate zum Eingrenzen der applizierten Feldstärken herangezogen wurden. Da knapp 90 % der WB-F344 Zellen 20 Pulse mit einer Feldstärke von 20 kV/cm überleben, wurden für die folgenden Versuche sowohl für die WB-F344 als auch für die WB-ras Feldstärken zwischen 10 und 20 kV/cm gewählt.

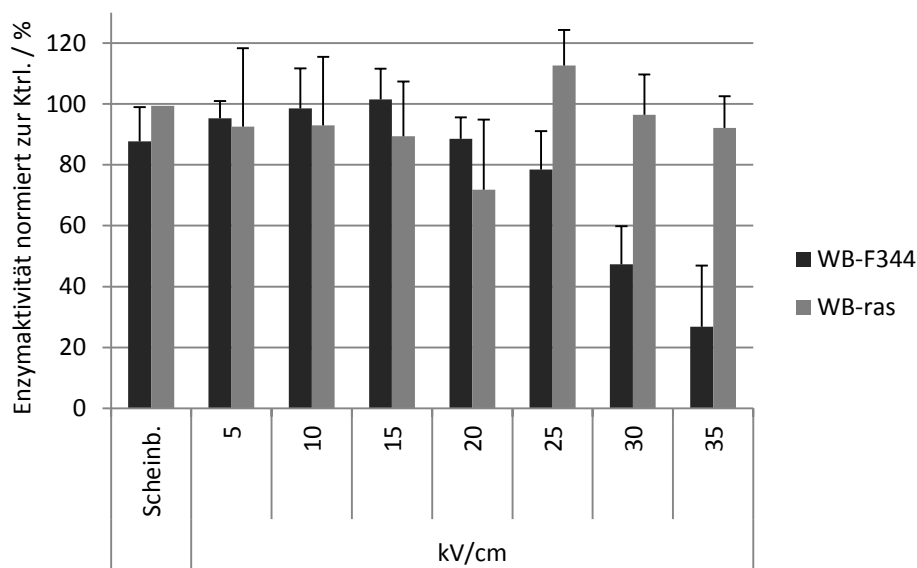


Abb. 3.5 Enzymaktivität von WB-F344 und WB-ras Zellen, nach der Behandlung mit 20 Pulsen mit einer Länge von 100 ns und Feldstärken zwischen 5 und 35 kV/cm. Das Diagramm zeigt die Mittelwerte \pm SE, normiert auf die Kontrolle (100 %), $n = 4$.



Abb. 3.6 Nachweis der Abwesenheit von Elektroporation über die Aufnahme von PI verglichen mit unbehandelten Zellen (a). Der Farbstoff wurde vor (b) und 5, 10 und 15 min nach dem Applizieren von 20 Pulsen mit einer Feldstärke von 20 kV/cm zugegeben (c-e). In den behandelten Zellen haben nicht mehr Zellen den rot fluoreszierenden Farbstoff aufgenommen als in der Kontrolle.

Um ausschließen zu können, dass Elektroporation einen Einfluss auf die Ergebnisse zur ZZZ hat, wurde der Farbstoff PI zu den Zellen gegeben und die Farbstoff-Aufnahme der

Zellen unter dem Mikroskop untersucht. Elektroporation konnte zu keiner der untersuchten Zeiten (0, 5, 10, 15 min nach nsPEFs) detektiert werden (Abb. 3.6).

3.4 Effekte von nsPEFs auf die Zell-Zell-Kommunikation

Die Kommunikation zwischen den Zellen wurde mittels Fluoreszenzfarbstoff-Transfer Assay bestimmt. Dazu wurde mit einer Rasierklinge ein Kratzer quer zur Position der Elektroden gesetzt (s. Kap. 2.5).

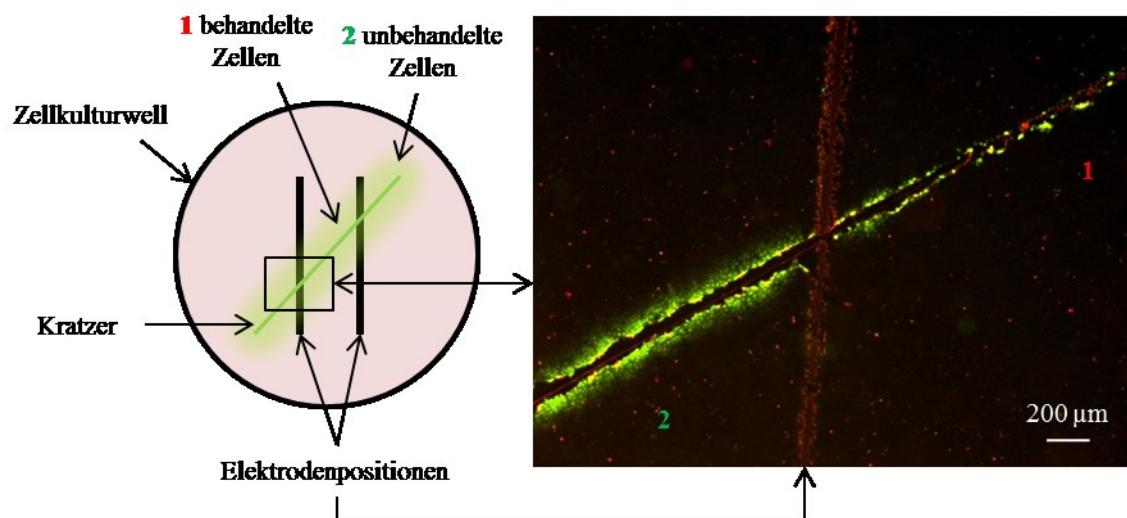


Abb. 3.7 Schematische Darstellung der Untersuchung der Zell-Zell-Kommunikation (linkes Bild). Unter dem Mikroskop ist die vorherige Position der Elektroden durch die mit Texas Red gefärbten Zellen erkennbar (rechtes Bild). Die Zellen zeigten nach der Behandlung mit 20 Pulsen mit 20 kV/cm (1) eine deutlich geringere Kommunikationsaktivität als unbehandelte Zellen (2).

Durch das Eindrücken der Elektroden in den Monolayer wurden die Zellen darunter beschädigt und nahmen den rot fluoreszierenden Farbstoff Texas Red auf, wodurch die Elektrodenpositionen unter dem Mikroskop deutlich als rote Linien erkennbar waren (Abb. 3.7). So ließen sich behandelte Zellen, die sich zwischen den Elektroden befanden, gut von unbehandelten unterscheiden.

Die beschädigten Zellen entlang des Kratzers haben sowohl den GJ-permeablen Farbstoff Lucifer Yellow (LY) (Abb. 3.8a) als auch den GJ-impermeablen Farbstoff Texas Red (TR) (Abb. 3.8b) aufgenommen. Während TR in den verletzten Zellen geblieben ist, konnte LY über GJs weiter in die benachbarten Zellen diffundieren, wie in Abb. 3.8 beispielhaft an einem unbehandelten WB-F344 Monolayer gezeigt.

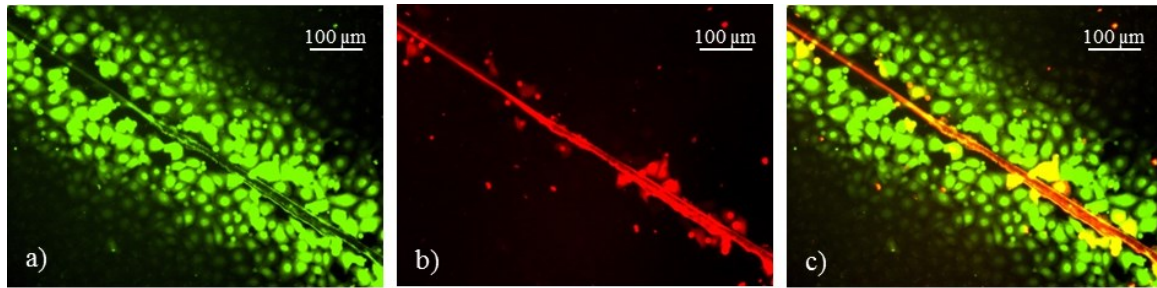


Abb. 3.8 Aufnahmen des Fluoreszenzfarbstoff-Transfer Assay an einem unbehandelten WB-F344 Monolayer mit LY, das GJ-permeabel ist (a), und TR, das GJ-impermeabel ist (b). TR bleibt in den beschädigten Zellen entlang des Kratzers, während LY über GJs in benachbarte Zellen diffundieren kann. (c) zeigt die überlagerten Fluoreszenzkanäle.

3.4.1 Effekte auf die Zell-Zell-Kommunikation von WB-F344

Die nicht-tumorigenen Rattenleberepithelzellen WB-F344 wurden in Monolayern mit 20 Pulsen, einer Pulslänge von 100 ns und Feldstärken zwischen 10 und 20 kV/cm behandelt. Abbildung 3.9 zeigt die Mikroskopie-Aufnahmen des Fluoreszenzfarbstoff-Transfer Assays 15, 30 und 60 min nach dem Applizieren der Pulse.

Es ist ein deutlicher Zeit- und Feldstärke-abhängiger Effekt der nsPEFs auf die ZZK zu erkennen. In Monolayern, die mit 20 kV/cm behandelt wurden, fluoreszierten nach 15 min nur einzelne Zellen entlang des Kratzers. Im Vergleich dazu war in Monolayern, die Pulsen mit einer Amplitude von 10 kV/cm ausgesetzt waren, die ZZK nach 15 min nur geringfügig herunterreguliert. Nach 30 bzw. 60 min hatte sich die Kommunikation für applizierte Feldstärken von 10 bzw. 15 kV/cm so weit erholt, dass nur noch ein geringer Unterschied zwischen behandelten Zellen und Kontrolle erkennbar war. Lediglich in Zellen, die mit 20 kV/cm behandelt wurden, war die ZZK auch noch nach 60 min deutlich herabreguliert.

Für die Auswertung wurde jeweils die fluoreszierende Fläche der Aufnahmen ermittelt und gegen die fluoreszierende Fläche der Kontrolle normiert (s. Kap. 2.5). Die entsprechenden Ergebnisse für alle untersuchten Zeitpunkte (5, 15, 30, 60 min und 24 h nach nsPEFs) sind in Abb. 3.10 gezeigt.

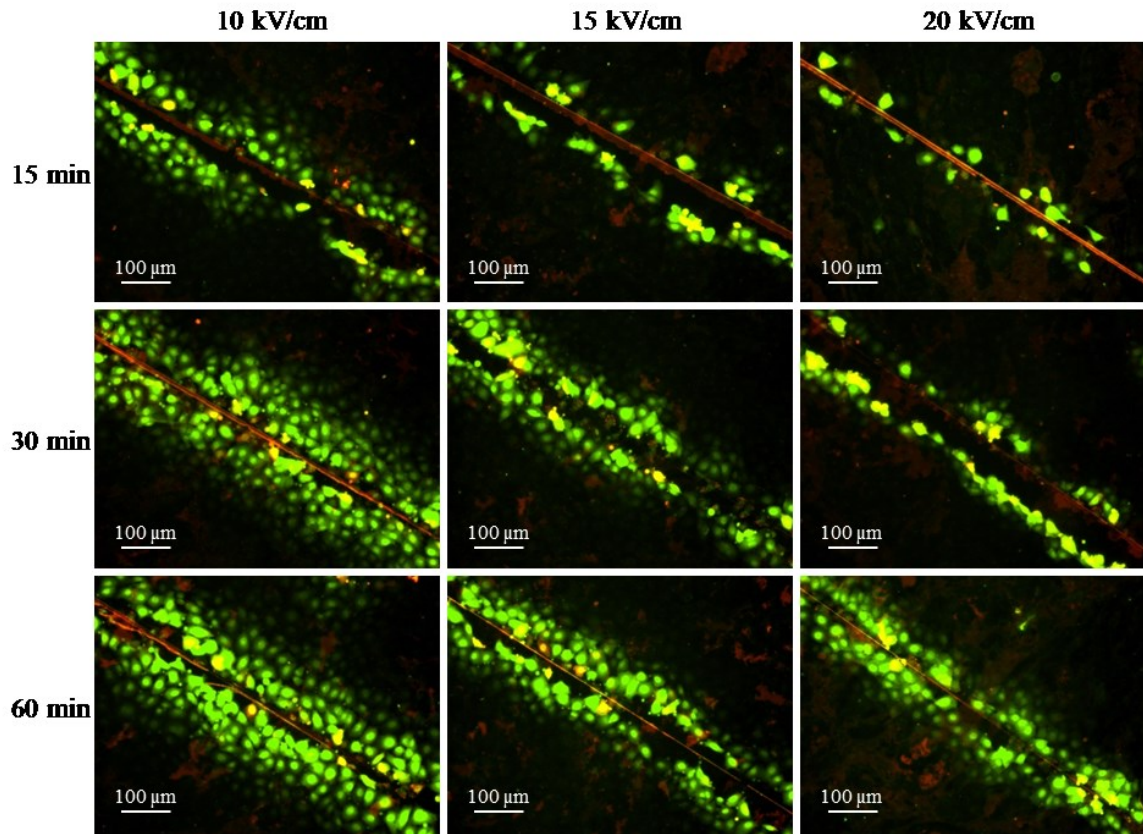


Abb. 3.9 Mikroskopie-Bilder des Fluoreszenzfarbstoff-Transfer Assays an WB-F344 Monolayern 15, 30 und 60 min nach der Behandlung mit 20 Pulsen (100 ns) mit Feldstärken von 10, 15 bzw. 20 kV/cm.

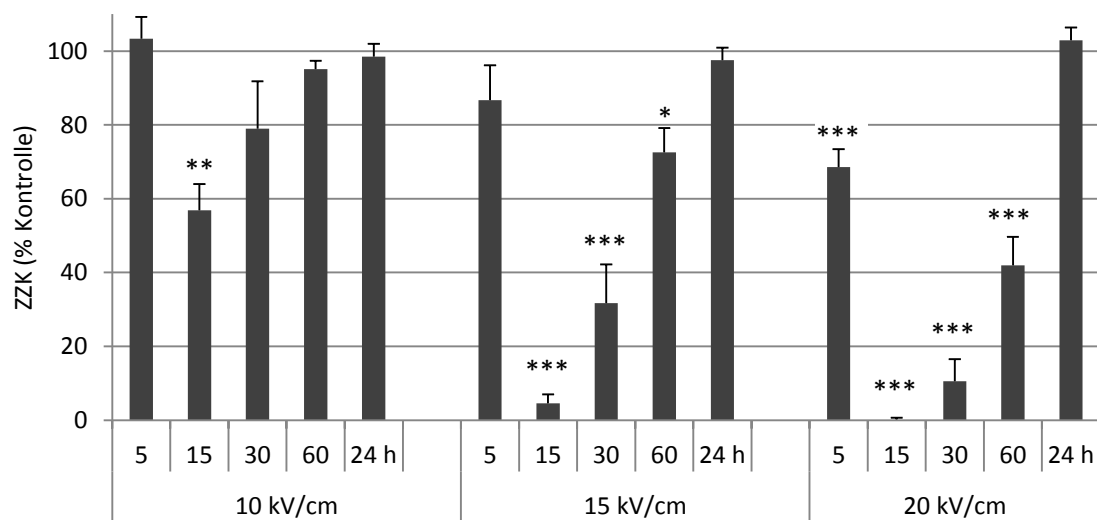


Abb. 3.10 Einfluss von nsPEFs auf die ZZK in WB-F344 Monolayern. Die Zellen wurden mit 20 Pulsen (100 ns) mit einer Amplitude von 10, 15 bzw. 20 kV/cm behandelt. Die ZZK ist Zeit- und Feldstärke-abhängig nach unten reguliert. Dargestellt sind die Mittelwerte prozentual im Vergleich zur Kontrolle \pm SD.

Fünf Minuten nach der Behandlung war die ZZK der Zellen, die Pulsen mit einer Feldstärke von 10 und 15 kV/cm ausgesetzt waren, nicht signifikant verändert. Im Gegensatz dazu war die Kommunikation in Monolayern, die mit 20 kV/cm behandelt wurden, bereits um über 30 % im Vergleich zur Kontrolle herabgesetzt. Die größten Unterschiede konnten 15 min nach der Behandlung detektiert werden. Hier war die ZZK für alle applizierten Feldstärken signifikant vermindert. Zellen, die Pulsen mit 10 kV/cm ausgesetzt waren, reduzierten ihre Kommunikation verglichen mit der Kontrolle fast um die Hälfte. 15 min nach der Behandlung mit 15 kV/cm kommunizierten die Zellen kaum noch und im Fall von Behandlungen mit 20 kV/cm war die ZZK komplett inhibiert. Eine halbe Stunde nach dem Applizieren der Pulse erholte sich die ZZK wieder. Für Feldstärken von 15 und 20 kV/cm war sie mit ca. 30 bzw. 10 % gegenüber der ursprünglichen Kommunikation aber immer noch signifikant vermindert. Nach einer Stunde war die Kommunikation in Monolayern, die mit 10 kV/cm behandelt wurden, fast wieder auf Kontrollniveau. Im Vergleich dazu war die Kommunikation zwischen Zellen, die Pulsen mit einer Feldstärke von 15 und 20 kV/cm ausgesetzt waren, auch nach 60 min noch signifikant vermindert. Die ZZK betrug ca. 70 bzw. 40 % der ursprünglichen Kommunikation. 24 h nach der Behandlung hatte sich die ZZK für alle untersuchten Feldstärken erholt und entsprach wieder dem Niveau der Kontrolle.

3.4.2 Änderung der Zell-Zell-Kommunikation in Abhängigkeit von der Feldstärke

In Abb. 3.11 ist die ZZK noch einmal in Abhängigkeit der applizierten Feldstärke dargestellt. In den ersten 5 min nach der nsPEF-Behandlung änderte sich die ZZK linear zur applizierten Feldstärke. D.h. die Änderung betrug für 15 kV/cm ca. 15 % und für 20 kV/cm etwa das Doppelte, nämlich 30 %. Bei 10 kV/cm trat nach 5 min noch keine Beeinträchtigung der ZZK auf. Auch 15 min nach dem Applizieren der Hochspannungspulse zeigte sich immer noch diese lineare Abhängigkeit von der Feldstärke, zumindest für Feldstärken von 10 und 15 kV/cm. Für Zellen, die 20 kV/cm ausgesetzt waren, war gar keine ZZK mehr nachweisbar. Während sich die Zahl an kommunizierenden Zellen im Fall von 10 kV/cm um ca. 40 % reduzierte, sank sie für 15 kV/cm um etwa das Doppelte (80 %). Ab 30 min nach der Behandlung mit nsPEFs begann sich die Kommunikation zwischen den Zellen zu erholen. Die Zellen schienen allerdings, unabhängig von der zuvor applizierten Feldstärke, dieselbe Regenerationszeit zu haben. So erholte sich die ZZK nach 30 min sowohl im Fall

von 10 als auch 15 kV/cm um rund 25 %. In Zellen, die Pulsen mit 20 kV/cm ausgesetzt waren, war die ZZK nach 30 min hingegen nur um ca. 10 % gestiegen. Dies könnte daran liegen, dass die Kommunikation zwischen den Zellen für diese Feldstärke zuvor komplett inhibiert war und die Zellen somit länger brauchten, um sich zu regenerieren, während im Fall von 10 und 15 kV/cm nach 15 min noch eine gewisse Restkommunikation erhalten geblieben war. Nach einer Stunde hatte sich die ZZK weiter erholt. Auch hier war eine lineare Charakteristik erkennbar. Für die Feldstärken von 15 und 20 kV/cm kommunizierten etwa 35 % mehr Zellen miteinander im Vergleich zum zuvor untersuchten Zeitpunkt nach 30 min. Dies gilt jedoch nicht für Zellen, die 10 kV/cm ausgesetzt waren, da deren ZZK bereits nach 60 min wieder annähernd auf dem Niveau der Kontrolle lag. Nach 24 h erlangten alle Zellen wieder die Fähigkeit entsprechend den unbehandelten Zellen zu kommunizieren.

Zusammenfassend lässt sich der Zusammenhang zwischen der Feldstärke der applizierten Hochspannungspulse und der ZZK folgendermaßen beschreiben: Mit jeder Erhöhung der Feldstärke um 5 kV/cm veränderte sich die ZZK gleichermaßen, d.h. bei einer Erhöhung um 5 kV/cm verdoppelte bzw. bei einer Erhöhung um 10 kV/cm verdreifachte sich die Anzahl der Zellen, die nicht mehr miteinander kommunizierten. Im Hinblick auf die Regenerationszeit der ZZK gab es keine Unterschiede. Die Kommunikation erholte sich über einen bestimmten Zeitraum für alle Feldstärken in gleichem Maße.

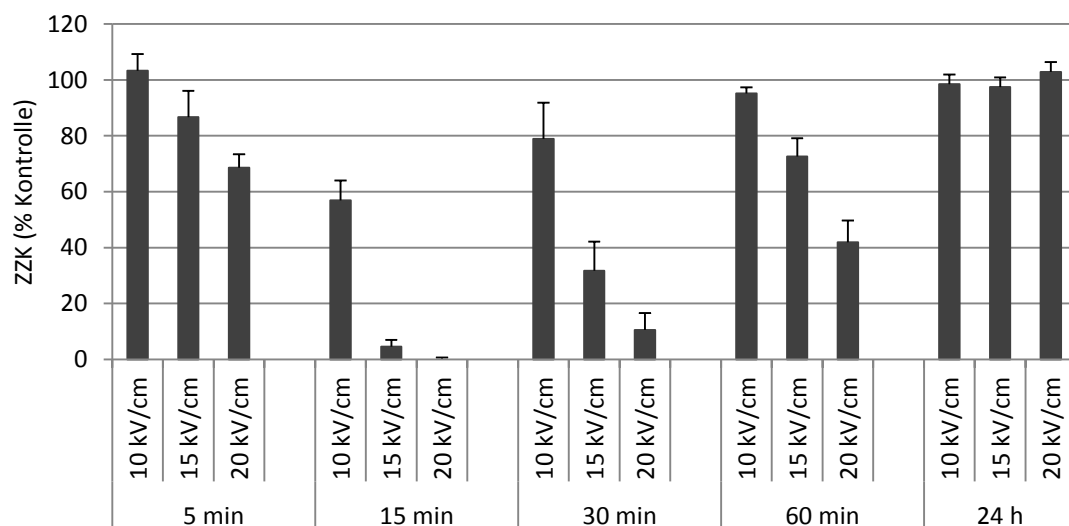


Abb. 3.11 Einfluss von nsPEFs auf die ZZK in WB-F344 Monolayern in Abhängigkeit von der Feldstärke. Dargestellt sind die Mittelwerte prozentual im Vergleich zur Kontrolle \pm SD für jeden untersuchten Zeitpunkt.

3.4.3 Effekte auf die Zell-Zell-Kommunikation von WB-ras

Zusätzlich zu den normalen Zellen wurde der Fluoreszenzfarbstoff-Transfer Assay auch an Monolayern der tumorigenen Zelllinie WB-ras durchgeführt, bei der es sich um mit dem Onkogen *ras* transformierte WB-F344 Zellen handelt. Eine inhibierte ZZK ist ein Charakteristikum von Krebszellen. So sollte untersucht werden, ob tumorigene Zellen in Hinblick auf die ZZK anders reagieren wie nicht-tumorigene Zellen und die ZZK in den WB-ras Zellen durch die Behandlung mit nsPEFs evtl. erhöht werden kann.

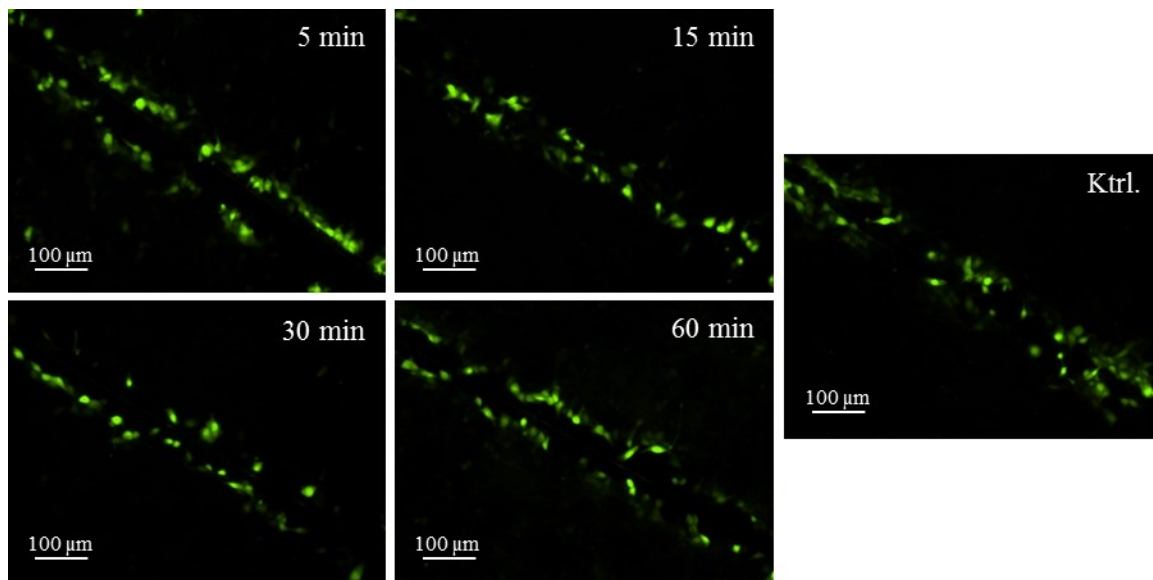


Abb. 3.12 Mikroskopie-Bilder des Fluoreszenzfarbstoff-Transfer Assays an WB-ras Monolayern 5, 15, 30 und 60 min nach der Behandlung mit 20 Pulsen mit einer Länge von 100 ns und einer Feldstärke von 20 kV/cm im Vergleich zur Kontrolle.

Abbildung 3.12 zeigt die Mikroskopie-Aufnahmen des LY-Kanals von WB-ras Zellen, die mit 20 Pulsen und einer Länge von 100 ns und einer Feldstärke von 20 kV/cm behandelt wurden. Zum Vergleich ist ein Bild der Kontrolle aufgeführt. Im Gegensatz zu den nicht-tumorigenen WB-F344 Zellen kommunizieren auch unbehandelte WB-ras Zellen kaum miteinander. Während 5 min nach der Behandlung der Zellen mit nsPEFs keine Änderung der ZZK verglichen mit der Kontrolle zu erkennen ist, ist die Kommunikation zwischen den Zellen 15 und 30 min nach der Behandlung komplett inhibiert. Nach 1 h ist kein Unterschied zur Kontrolle zu sehen. Die ZZK konnte in WB-ras Zellen durch die Behandlung mit nsPEFs also nicht erhöht bzw. auf das Niveau der WB-F344 Zellen gebracht werden.

Da die tumorigenen WB-ras Zellen kaum eine Änderung der ZZK nach dem Applizieren der nsPEFs aufwiesen, beschränkten sich die weiteren Versuche auf die Untersuchung der nicht-tumorigenen Zelllinie WB-F344.

3.4.4 Vergleich von Behandlungen der Zellen mit 20 und 100 Pulsen

Neben den Parametern wie Pulslänge und Feldstärke kann auch die Pulsanzahl einen Einfluss auf die durch gepulste elektrische Felder in Zellen hervorgerufenen Effekte haben. Deshalb wurden der MTT-Test und der Fluoreszenzfarbstoff-Transfer Assay zusätzlich nach der Behandlung der Zellen mit 100 Pulsen (100 ns) durchgeführt. In diesem Fall überlebten nur etwa 60 % der WB-F344 Zellen eine Feldstärke von 15 kV/cm (Daten nicht gezeigt). Aufgrund dieser Ergebnisse wurde für den Fluoreszenzfarbstoff-Transfer Assay für die Behandlung mit 100 Pulsen eine Amplitude von 10 kV/cm gewählt, die etwa den subletalen Bedingungen von 20 kV/cm im Fall von 20 Pulsen entsprach. Der Fluoreszenzfarbstoff-Transfer Assay wurde 15, 30 und 60 min nach der Behandlung der WB-F344 Zellen mit 100 Pulsen und einer Feldstärke von 10 kV/cm durchgeführt (Abb. 3.13).

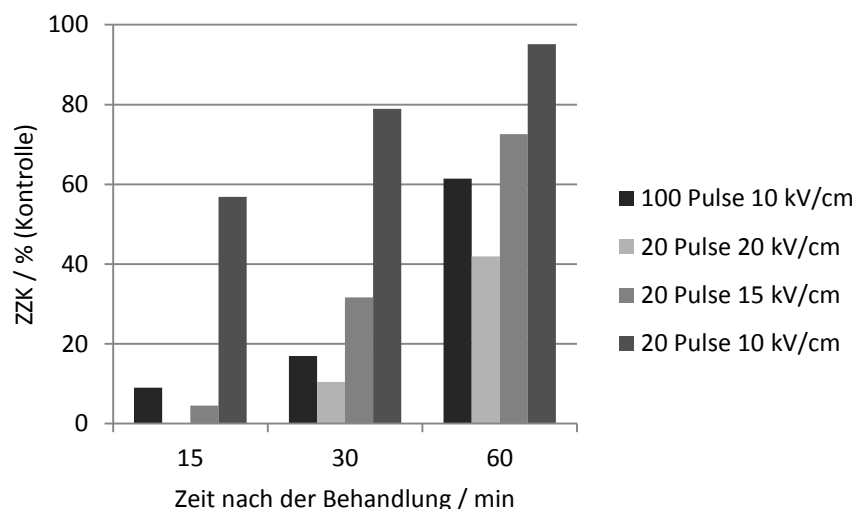


Abb. 3.13 Vergleich der ZZK in WB-F344 Monolayern nach der Behandlung mit 100 Pulsen bzw. 20 Pulsen, die gegen jeweilige Kontrollen normiert wurden.

Der Effekt auf die ZZK nach der Behandlung mit 100 Pulsen ähnelte dem zeitlichen Verlauf der ZZK von Zellen, die 20 Pulsen mit einer Feldstärke von 15 kV/cm ausgesetzt wurden. Die Zellen, die 100 Pulsen ausgesetzt worden waren, behielten 15 min nach der Behandlung eine Restkommunikation von knapp 10 % im Vergleich zur Kontrolle. Die Kom-

munikation nach der Applikation von 20 Pulsen mit 15 kV/cm betrug noch ca. 4.5 %. Während die ZZK in den Versuchen mit 20 Pulsen und 15 kV/cm zum nächsten untersuchten Zeitpunkt nach 30 min um ca. 25 % auf etwa 30 % anstieg, erhöhte sich die Kommunikation nach dem Applizieren von 100 Pulsen jedoch nur um weniger als 10 % auf 17 %. Dafür hatten sich die mit 100 Pulsen behandelten Zellen nach 60 min um weitere 45 % auf über 60 % regeneriert, wohingegen sich die Zellen, die mit 20 Pulsen behandelt worden waren, nur um weitere 35 % erholt hatten. Mit einer ZZK von über 70 % im Vergleich zur Kontrolle kommunizierten die mit 20 Pulsen behandelten Zellen nach 60 min damit allerdings immer noch mehr als die mit 100 Pulsen behandelten Zellen, trotz der geringeren ZZK zu Anfang (nach 15 min). Insgesamt erholte sich die Kommunikation zwischen den Zellen nach der Behandlung mit 100 Pulsen also etwas langsamer verglichen mit 20 Pulsen und 15 kV/cm.

Sowohl das Ausmaß der Inhibierung als auch die Regenerationszeit der ZZK unterscheiden sich demnach je nach Anzahl der applizierten Hochspannungspulse. Um festzustellen, ob es diesbezüglich für die Behandlung der Zellen mit 100 Pulsen eine ähnliche Gesetzmäßigkeit gibt, wie nach der Applikation von 20 Pulsen, müssten weitere Versuche mit 100 Pulsen mit unterschiedlichen Feldstärken durchgeführt werden.

Da die Ergebnisse nach der Applikation von 100 Pulsen im Vergleich zu 20 Pulsen hinsichtlich der ZZK keine wesentlichen Unterschiede zeigten, wurde dieser Ansatz nicht weiter verfolgt und die folgenden Versuche beschränkten sich auf die Untersuchung der WB-F344 Zellen, die mit 20 Pulsen mit einer Feldstärke zwischen 10 und 20 kV/cm behandelt wurden.

3.5 Immunfluoreszenzfärbungen von Cx43, F-Aktin und ZO-1

Wie in Kap. 3.4 gezeigt, führte die Behandlung von Monolayern mit nsPEFs zu einer verminderten Kommunikation über GJs zwischen den Zellen. Um die dem Effekt zugrundeliegenden Mechanismen aufzudecken, wurde die Verteilung von Cx43 in WB-F344 Zellen mittels Immunfluoreszenzfärbung sichtbar gemacht. Da für den Auf- und Abbau von GJs ein intaktes Zytoskelett notwendig ist, wurde zusätzlich das F-Aktin angefärbt.

Abb. 3.14 zeigt die Immunfluoreszenzfärbung von WB-F344 Monolayern, die mit 20 Pulsen mit einer Feldstärke von 20 kV/cm behandelt wurden. In den unbehandelten Zellen sind deutlich große, helle Punkte zu erkennen, die sich vor allem in der Plasmamembran befin-

den und die Zellen miteinander verbinden. Diese Punkte stellen GJs-Plaques dar. Im Zytoplasma konnte kaum Cx43 nachgewiesen werden. Des Weiteren zeigte die Färbung ein intaktes Zytoskelett mit normal strukturierten Aktinfasern, die sich gleichmäßig über die Zelle erstreckten (Abb. 3.14a). 5 min nach dem Applizieren der Pulse hatte sich die Cx43-Verteilung kaum verändert. Cx43 war weiterhin in die Zellmembran integriert, allerdings schienen die GJs-Plaques, verglichen mit der Kontrolle, etwas kleiner zu sein. Im Gegensatz dazu konnten jedoch kaum noch intakte Aktinfasern gefunden werden (Abb. 3.14b). 15 min nach dem Anlegen der elektrischen Pulse waren immer noch einzelne GJ-Plaques in der Membran zu finden, gleichzeitig hatte sich aber auch der Anteil an zytosolischem Cx43 erhöht. Das Zytoskelett wies weiterhin keine intakten Aktinfasern auf (Abb. 3.14c). Eine halbe Stunde nach dem Anlegen der elektrischen Felder war fast kein Cx43 mehr in der Plasmamembran nachweisbar. Die zuvor durch die GJs beschriebenen Zellumrisse waren nicht mehr erkennbar. Das Fluoreszenzsignal des Cx43 im Zellinneren war ähnlich wie bereits nach 15 min erhöht, was darauf hinweist, dass die GJs in der Membran abgebaut und das Connexin ins Zellinnere transportiert wurde. Die Aktinfasern wiesen kaum eine Änderung zum zuvor untersuchten Zeitpunkt auf (Abb. 3.14d). Eine Stunde nach der Behandlung der Zellen mit nsPEFs waren wieder einzelne GJs-Spots in der Plasmamembran nachweisbar. Zudem waren auch einzelne definierte Punkte im Zellinneren zu erkennen, die darauf hindeuteten, dass Connexone zurück zur Membran transportiert wurden. Gleichzeitig nahm das diffuse Fluoreszenzsignal für Cx43 im Zellinneren ab. Auch das Zytoskelett erholte sich wieder, auch wenn die Aktinfasern noch nicht wieder so geordnet waren wie in der Kontrolle.

Die Immunfluoreszenzfärbung wurde auch an Zellen durchgeführt, die mit 20 Pulsen mit einer Feldstärke von 15 kV/cm behandelt wurden. Die Ergebnisse sowohl für Cx43 als auch für das Aktin-Zytoskelett sind vergleichbar mit denen von Zellen, die 20 kV/cm ausgesetzt waren, jedoch sind die Veränderungen weniger ausgeprägt. Im Gegensatz zu Zellen, die mit 20 kV/cm behandelt wurden, war in Zellen, die nur 15 kV/cm ausgesetzt waren, nicht das komplette Cx43, d.h. nicht alle GJs, aus der Membran abgebaut (Daten nicht gezeigt).

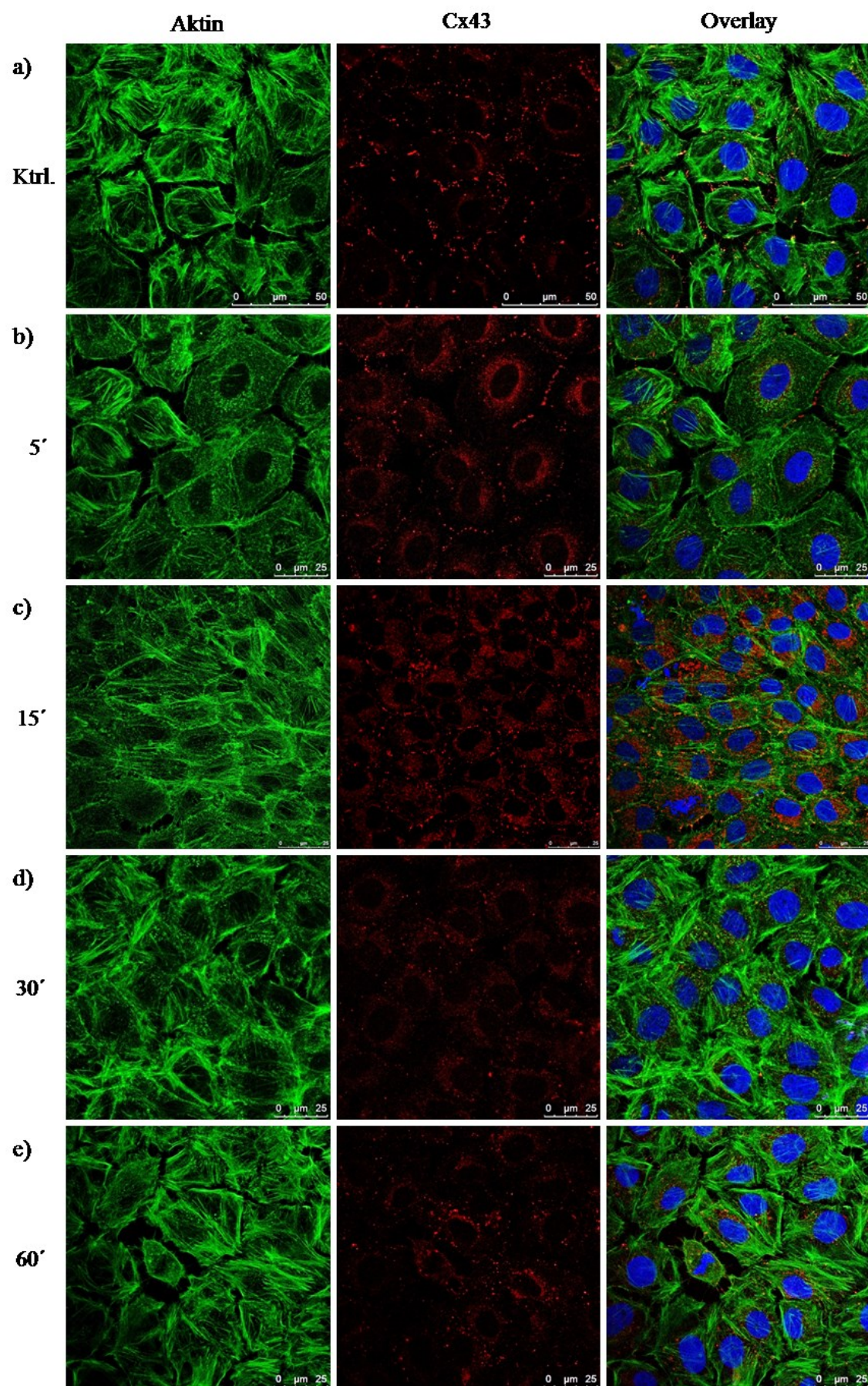


Abb. 3.14 (auf S. 50) Immunfluoreszenzfärbung von Aktin (grün) und Cx43 (rot) in einem unbehandelten WB-F344 Monolayer (a) und 5, 15, 30 und 60 min nach dem Applizieren von 20 Pulsen mit einer Feldstärke von 20 kV/cm (b-e). (blau: Nuklei)

Der Effekt auf die ZZK war 15 min nach der Behandlung mit 20 kV/cm am ausgeprägtesten. Für diese Behandlungsparameter war die Kommunikation komplett inhibiert. Um auszuschließen, dass die Zellen nicht mehr kommunizierten, nur weil sie den Kontakt zu ihren benachbarten Zellen verloren hatten, wurde 15 min nach der Behandlung der Zellen mit 20 kV/cm das Tight Junction Protein ZO-1 angefärbt (Abb. 3.15). In der Kontrolle waren die Umrisse der Zellen klar anhand des ZO-1 Proteins zu erkennen und es war kaum ZO-1 im Zellinneren zu finden (Abb. 3.15a). 15 min nach der Behandlung mit 20 Pulsen mit 20 kV/cm waren die durch ZO-1 umschriebenen Zellränder im Vergleich zur Kontrolle nicht mehr so klar definiert (Abb. 3.15b). Aber insgesamt waren die Zellen im Monolayer weiterhin dicht gepackt und hatten Kontakt zu angrenzenden Zellen.

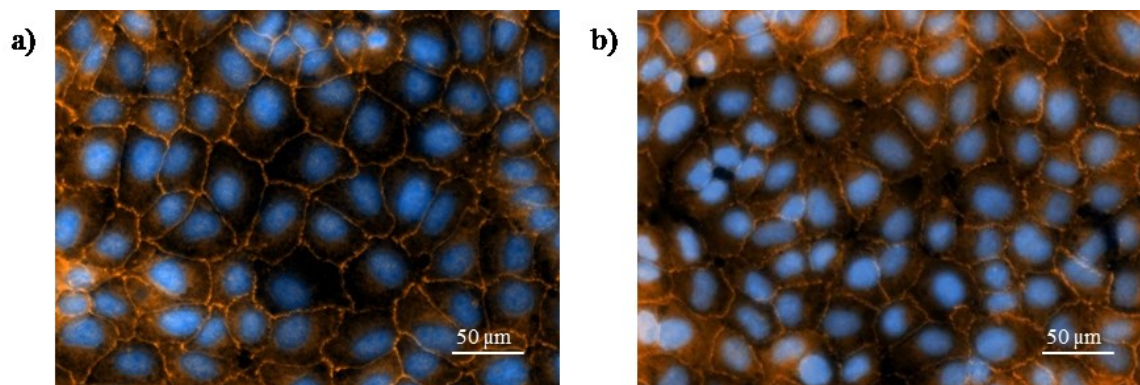


Abb. 3.15 Immunfluoreszenzfärbung des Tight Junction Proteins ZO-1 (orange) in einem unbehandelten WB-F344 Monolayer (a) und 15 min nach der Behandlung mit 20 Pulsen mit einer Amplitude von 20 kV/cm (b). (blau: Nuklei)

3.6 Analyse der Cx43-Genexpression

Die Immunfluoreszenzfärbung zeigte, dass die GJs nach der Behandlung der Zellen mit nsPEFs aus der Membran abgebaut wurden. Um festzustellen, ob der Abbau der GJs mit einer veränderten Genexpression verbunden und kein direkter Feldeffekt war, wurde der mRNA-Level von Cx43 mittels qPCR in WB-F344 Zellen untersucht (Abb. 3.16).

Die Genexpression von Cx43 wurde 30 min und 1, 3, 6, 24 und 48 h nach der Behandlung der Zellen mit 20 Pulsen mit Feldstärken von 10, 15 und 20 kV/cm analysiert. Die mRNA-

3 Ergebnisse

Level von Cx43 sind Zeit- und Feldstärke-abhängig verändert, wobei sich die signifikantesten Änderungen eine Stunde nach dem Applizieren von Pulsen mit 20 kV/cm zeigten. Für diese Feldstärke war die Genexpression 30 min nach der Behandlung fast um die Hälfte vermindert. Nach einer Stunde sank sie noch weiter ab auf einen Wert von etwa 45 % im Vergleich zur Kontrolle. 3 h nach dem Anlegen der Pulse befand sich der mRNA-Level fast wieder auf dem Niveau der Kontrolle, fiel nach 6 h aber wieder auf einen Wert von etwa 70 %. Auch 24 und 48 h nach der Behandlung der Zellen war die Genexpression noch um etwa 40 % im Vergleich zur Kontrolle vermindert. Die Änderungen der Genexpression in Zellen, die mit Feldstärken von 10 bzw. 15 kV/cm behandelt wurden, sind ähnlich wie die für 20 kV/cm, nur weniger ausgeprägt. Nach 30 bis 60 min waren die mRNA-Level auf Werte zwischen 60 und 70 % im Vergleich zur Kontrolle abgesunken. Nach 3 h stieg die Genexpression wieder auf 70 bzw. 80 % für Feldstärken von 10 bzw. 15 kV/cm. In Zellen, die mit 15 kV/cm behandelt wurden, blieb der mRNA-Level 6, 24 und 48 h nach dem Applizieren der Pulse relativ konstant auf einem Wert von etwa 65 % im Vergleich zur Kontrolle, während die Werte für Zellen, die mit 10 kV/cm behandelt wurden, zwischen 66 und 80 % schwankten.

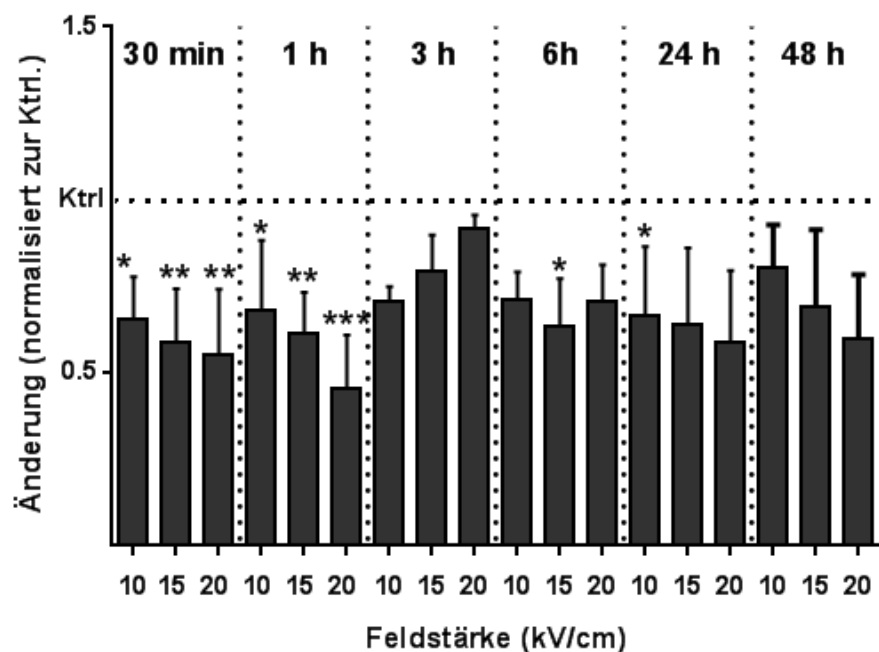


Abb. 3.16 Analyse der mRNA Expression von Cx43 30 min und 1, 3, 6, 24 und 48 h nach der Behandlung der WB-F344 Zellen mit 20 Pulsen mit 10, 15 bzw. 20 kV/cm. Dargestellt sind die Mittelwerte prozentual im Vergleich zur Kontrolle \pm SD.

3.7 Analyse der MAP-Kinase-Aktivierung und der Proteinexpression von Cx43

Die ZZK über GJs wird sowohl über die Menge an GJs in der Plasmamembran als auch deren Öffnungszustand reguliert. Diese Größen wiederum werden durch den Phosphorylierungsstatus der Connexine und die Aktivierung von MAP-Kinasen beeinflusst. Deshalb wurden die Aktivierung von p38 und Erk1/2 und die Phosphorylierung von Cx43 nach der Behandlung der WB-F344 Zellen mit 20 Pulsen mit Feldstärken von 10, 15 und 20 kV/cm analysiert. Die Proben zur Untersuchung der MAP-Kinasen wurden 15 und 30 min und 1, 3 und 6 h nach dem Applizieren der Pulse gesammelt.

Die Proteinkonzentrationen der Proben waren mit nur ca. 1 µg/µl relativ gering. Zudem konnte nicht ausgeschlossen werden, dass Proteine, die für gewöhnlich als Housekeeping-Proteine genutzt werden, wie z.B. Aktin, ebenfalls durch die Behandlung der Zellen mit nsPEFs verändert wurden. Deshalb wurden die Werte gegen das Gesamtprotein normalisiert. Dazu wurde zuerst das Gesamtprotein für jede Spur mit der Analyse Toolbox bestimmt. Anschließend wurde das Volumen jeder Bande mit der 1D-Gelanalyse ermittelt. Die Volumina der Banden wurden gegen das Gesamtprotein normalisiert und diese Werte gegen die Kontrolle normiert. Daraus ergaben sich die relativen Änderungen der behandelten Proben im Vergleich zur Kontrolle.

3.7.1 Erk1/2

Die Analyse von Erk1/2 zeigte eine signifikante Zeit- und Feldstärke-abhängige Phosphorylierung (Abb. 3.17). Zellen, die mit 20 kV/cm behandelt wurden, wiesen nach 15 min eine fast 9-fach erhöhte Aktivierung von Erk2 im Vergleich zur Kontrolle auf. Das Applizieren von Pulsen mit einer Feldstärke von 10 bzw. 15 kV/cm führte zu einer Erhöhung der Phosphorylierung von Erk2 auf das 2- bzw. 3-fache. Eine Stunde nach der Behandlung der Zellen mit 20 kV/cm sank der phosphorylierte Anteil von Erk2 im Vergleich zum Zeitpunkt nach 15 min ab, war aber immer noch etwa 6-fach erhöht im Vergleich zur Kontrolle. Der Wert für Erk2 für 15 kV/cm war auf Kontroll-Niveau gesunken. Nach 6 h waren alle Werte im Bereich der Kontrolle. Im Gegensatz zu Erk2 war für alle applizierten Feldstärken kaum eine Änderung im Phosphorylierungsmuster von Erk1 detektierbar.

3 Ergebnisse

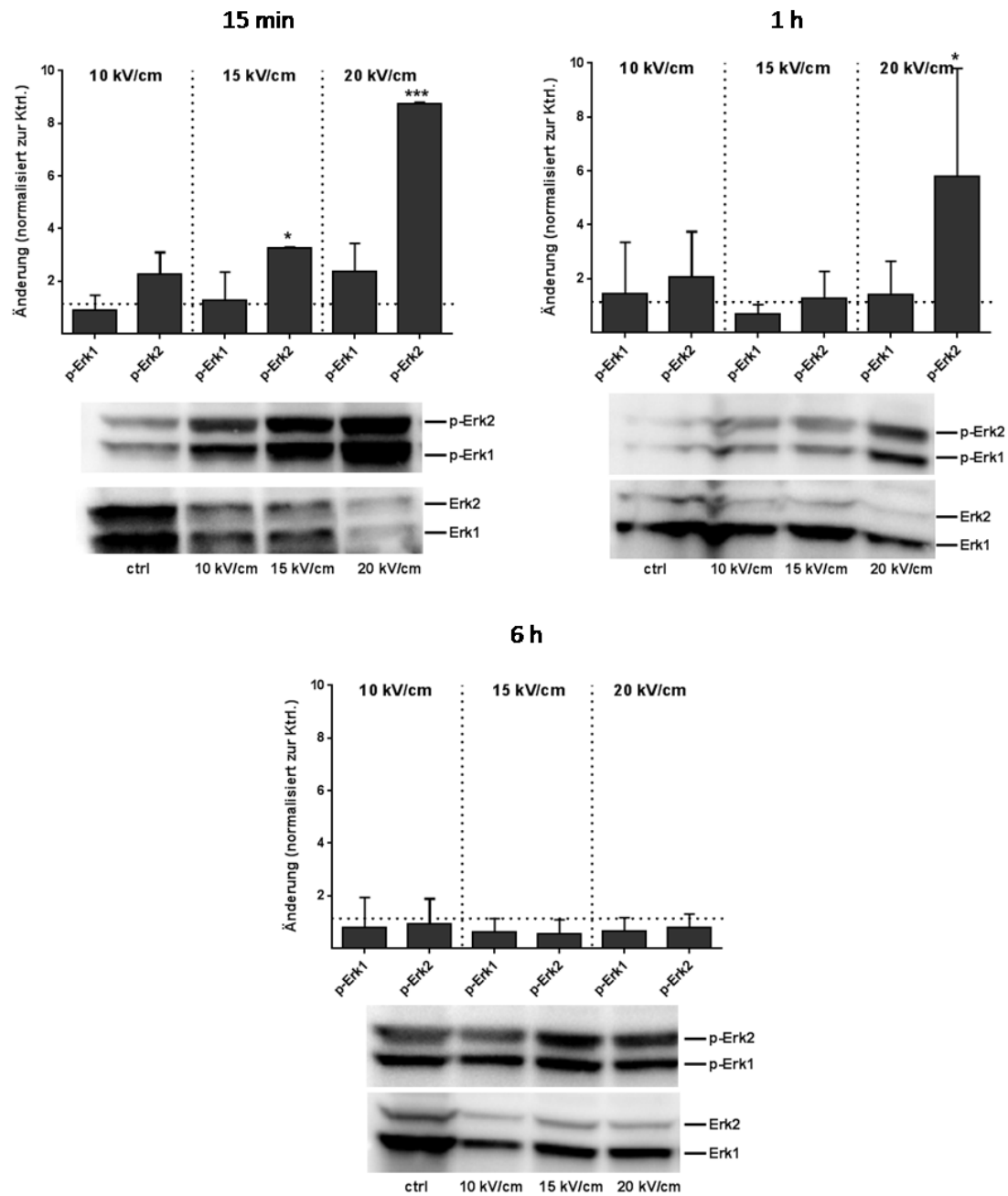


Abb. 3.17 Verhältnis von phosphoryliertem zu unphosphoryliertem Erk1/2 15 min und 1 und 6 h nach der Behandlung der WB-F344 Zellen mit 20 Pulsen mit 10, 15 bzw. 20 kV/cm. Dargestellt sind die Mittelwerte der Änderungen im Vergleich zur Kontrolle (gepunktete Linie) \pm SD.

3.7.2 p38

Im Gegensatz zu Erk1/2 zeigte die Analyse von p38 eine späte Phosphorylierung, die erst 6 h nach der Behandlung der Zellen mit nsPEFs auftrat. Die Aktivierung von p38 war aber ebenfalls Feldstärke-abhängig (Abb. 3.18).

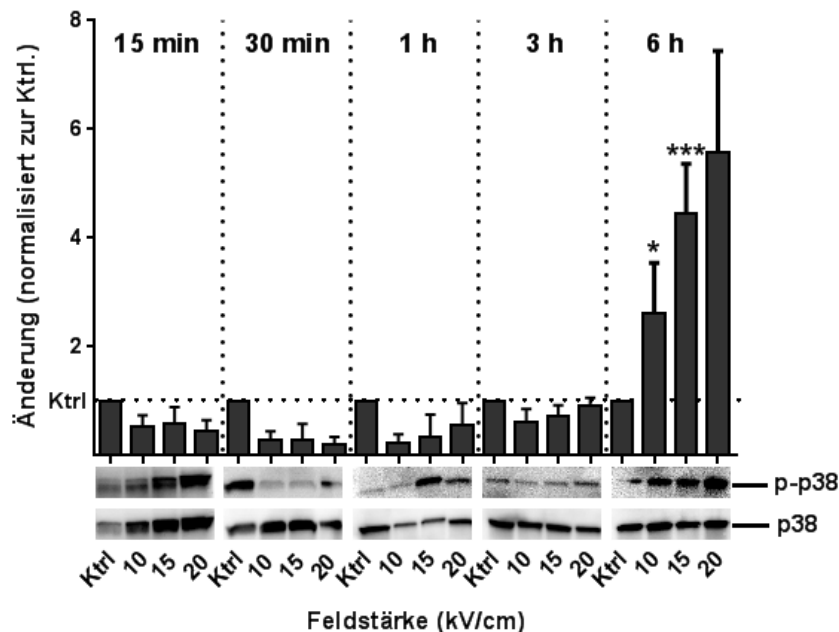


Abb. 3.18 Verhältnis von phosphoryliertem zu unphosphoryliertem p38 15 und 30 min und 1, 3 und 6 h nach der Behandlung der WB-F344 Zellen mit 20 Pulsen mit 10, 15 bzw. 20 kV/cm. Dargestellt sind die Mittelwerte der Änderungen im Vergleich zur Kontrolle (gepunktete Linie) \pm SD.

Der phosphorylierte Anteil an p38 stieg 6 h nach der Behandlung der Zellen mit 20 kV/cm auf ungefähr das 5,5-fache im Vergleich zur Kontrolle an. In Zellen, die 10 und 15 kV/cm ausgesetzt waren, erhöhte sich die Aktivierung von p38 nach 6 h etwa um das 2,5- bzw. 4,5-fache. Zu allen anderen untersuchten Zeitpunkten waren die phosphorylierten Anteile von p38 im Bereich der Kontrolle bzw. sogar etwas unterhalb des Kontroll-Niveaus.

3.7.3 Cx43

Die Gelelektrophorese zur Detektion von Cx43 zeigte drei getrennte Banden, die die unterschiedlichen Phosphorylierungszustände des Connexins widerspiegeln. Dabei steht die P0-Bande für das unphosphorylierte, die P1-Bande für das phosphorylierte und die P2-Bande für das hyperphosphorylierte Cx43. Eine Hyperphosphorylierung von Connexin wird mit der Inhibierung der ZZZK assoziiert. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.19 dargestellt.

3 Ergebnisse

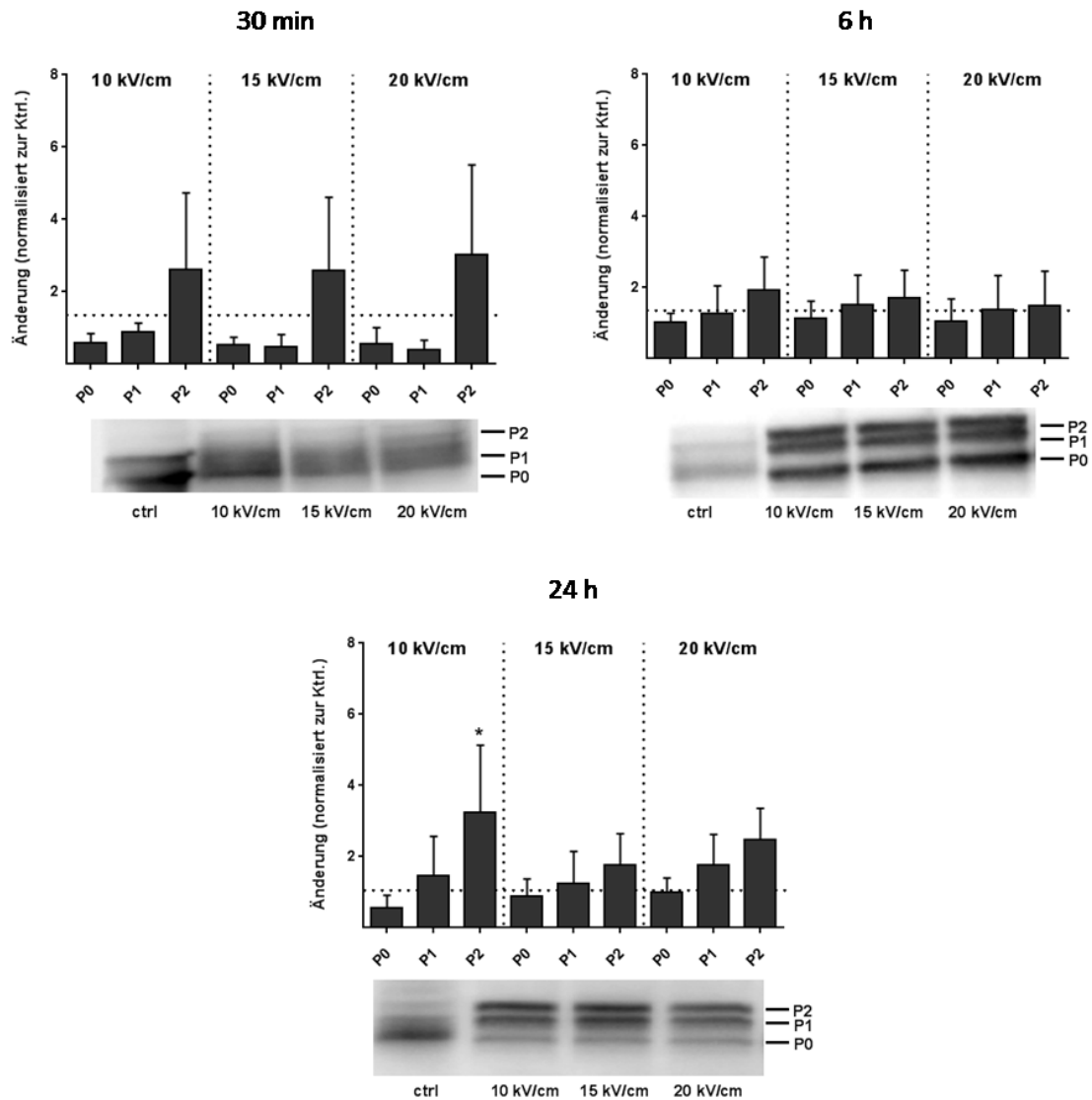


Abb. 3.19 Verhältnis von phosphoryliertem zu unphosphoryliertem Cx43 30 min und 6 und 24 h nach der Behandlung der WB-F344 Zellen mit 20 Pulsen mit 10, 15 bzw. 20 kV/cm. Dargestellt sind die Mittelwerte der Änderungen im Vergleich zur Kontrolle (gepunktete Linie) \pm SD.

Die Behandlung der WB-F344 Zellen mit nsPEFs führte 30 min nach dem Applizieren der Pulse für alle untersuchten Feldstärken zu einem 2,5- bis 3-fachen Anstieg des hyperphosphorylierten Anteils an Cx43 (P2) im Vergleich zur Kontrolle. Gleichzeitig sank der Anteil an phosphoryliertem (P1) und unphosphoryliertem Cx43 (P0) etwa auf die Hälfte ab. Nach 6 h befanden sich die Werte für alle Phosphorylierungszustände für alle Feldstärken wieder ungefähr auf Kontroll-Niveau. Lediglich im Fall der mit 10 kV/cm behandelten Zellen war der Wert für P2 leicht, jedoch nicht signifikant, auf etwa das 2-fache erhöht. 24 h nach der Behandlung hingegen war der Anteil an hyperphosphoryliertem Cx43 in Zellen, die mit

einer Feldstärke von 10 kV/cm behandelt wurden, signifikant um etwa das 3-fache im Vergleich zur Kontrolle gestiegen. Gleichzeitig war die Menge an unphosphoryliertem Cx43 ungefähr um die Hälfte gesunken. Der phosphorylierte Anteil war nur leicht erhöht. Die Änderungen in Zellen, die mit 15 und 20 kV/cm behandelt wurden, waren nicht signifikant. Hier stieg der Wert für P2 auf das 1,5- bis 2-fache, während P1 im Vergleich zur Kontrolle nur leicht erhöht war und sich P0 im Bereich der Kontrolle befand.

Die Genexpression von Cx43 war nach der Behandlung der Zellen mit nsPEFs signifikant vermindert, deshalb wurde zusätzlich zum Phosphorylierungsstatus auch die Gesamtmenge an Cx43 untersucht (Abb. 3.20). Dazu wurden die Werte der P0-, P1- und P2-Bande addiert.

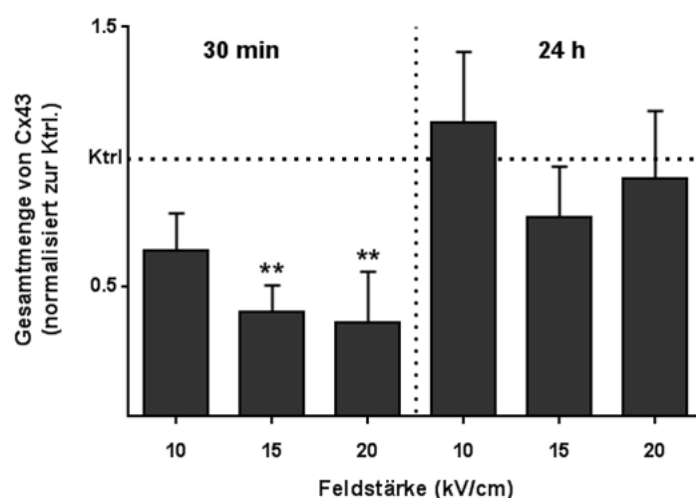


Abb. 3.20 Änderung der Gesamtmenge an Cx43 30 min und 24 h nach der Behandlung der WB-F344 Zellen mit 20 Pulsen mit 10, 15 und 20 kV/cm. Dargestellt sind die Mittelwerte der Änderungen im Vergleich zur Kontrolle (gepunktete Linie) \pm SD.

Eine halbe Stunde nach dem Applizieren der Pulse war die Gesamtmenge in Zellen, die mit 15 und 20 kV/cm behandelt wurden, signifikant um mehr als die Hälfte reduziert. In Zellen, die einer Feldstärke von 10 kV/cm ausgesetzt waren, betrug die Cx43-Expression nach 30 min noch etwa 60 % des Kontrollwertes. 24 h nach der Behandlung der Zellen befand sich die Gesamtproteinmenge an Cx43 für alle angelegten Feldstärken wieder im Bereich der Kontrolle.

3.8 Effekte von nsPEFs auf die Elastizität von Zellen

Der Elastizitätsmodul verhält sich proportional zur applizierten Kraft und antiproportional zum Quadrat der Eindringtiefe der Spitze des Cantilevers in die Zelle. Folglich bedeuten

niedrige Elastizitätsmoduln von nur wenigen kPa, dass die Struktur eher weich ist, während hohe Elastizitätsmoduln mit Werten von über 100 kPa auf steifere Strukturen verweisen. Maligne Zellen sind wesentlich weicher als gesunde (s. Kap. 1.3), zudem hängt die Zell-elastizität stark vom Zelltyp ab. Da in der vorliegenden Arbeit die mit dem Onkogen ras transformierten WB-F344 Zellen als Tumorzelllinie zu den normalen WB-F344 Zellen untersucht wurden, sind beide Zelllinien in Bezug auf ihre Elastizität direkt miteinander vergleichbar. Ziel der rasterkraftmikroskopischen Messungen war es herauszufinden, ob Zellen, die mit nsPEF behandelt wurden, anschließend eine ähnliche Elastizität aufweisen wie Tumorzellen und somit eventuell auch die mit einer geringen Elastizität assoziierten Eigenschaften hinsichtlich Malignität und Invasivität annehmen. Die AFM-Messungen wurden nur an Zellen durchgeführt, die mit einer Feldstärke von 20 kV/cm behandelt wurden, da die zuvor beschriebenen Veränderungen bezüglich ZZK und Umstrukturierung des Aktin-Zytoskeletts hier am größten waren.

Abb. 3.21 zeigt eine typische AFM-Aufnahme der Topographie und der Elastizitätsmoduln eines unbehandelten WB-F344 Monolayers bei einer Eindringtiefe des Cantilevers von 300 nm. In den topographischen Aufnahmen (linkes Bild) stellen sich erhöhte Strukturen im Vergleich zu flacheren Zellabschnitten heller dar. Im Fall der Elastizitätsmoduln (rechtes Bild) sind weichere Bereiche dunkler abgebildet. D.h. je steifer eine Struktur ist, desto heller erscheint sie im Bild.

Die topographische Darstellung zeigt, dass der Zellkern (grüner Pfeil) gegenüber dem Zellrand (gelber Pfeil) erhaben ist. Zudem sind zahlreiche, parallel ausgerichtete Aktinfasern zu erkennen (rote Pfeile), die sich über die komplette Zelle erstrecken und am Zellrand in gegenüberliegenden „Polen“ zusammenlaufen (blaue Pfeile). Die beschriebenen Strukturen sind auch über die Verteilung der Elastizitätsmoduln gut erkennbar. Der Bereich über dem Zellkern (grüner Pfeil) ist deutlich weicher als der Rest der Zelle, ersichtlich an der dunkleren Darstellung. Da die Aktinfasern, die sich über den Zellkörper erstrecken, steifer sind als der den Zellkern umgebende Cortex, heben sie sich als helle Linien vom Untergrund ab (rote Pfeile). Auch die Zellränder, die wesentlich steifer sind als der restliche Zellkörper, sind deutlich zu erkennen (gelber Pfeil). Die steifsten Bereiche der Zelle bilden jedoch die Bereiche, in denen die Aktinfasern am Zellrand zusammenlaufen (blaue Pfeile).

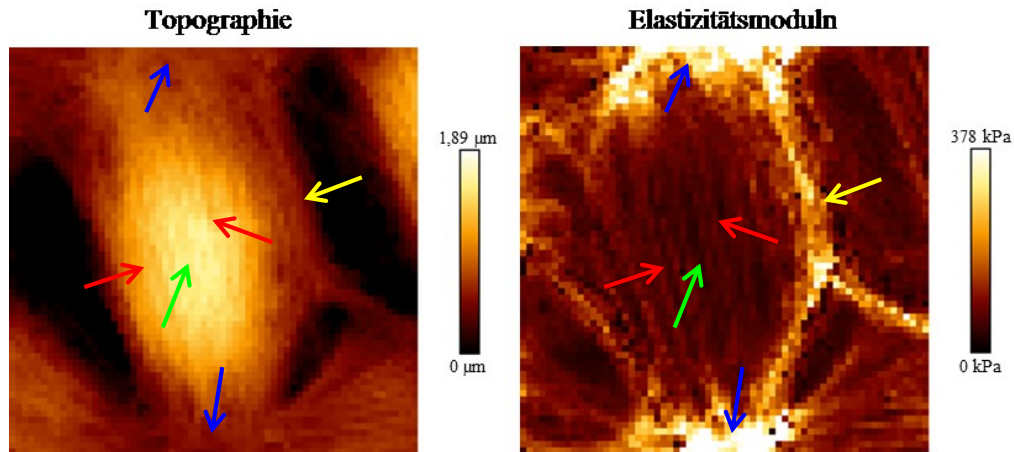


Abb. 3.21 Typische AFM-Aufnahme eines unbehandelten WB-F344 Monolayers. Das linke Bild zeigt die Oberflächen-Topographie, das rechte die Elastizitätsmoduln der Zellen. Beide Bilder gehen aus derselben Messung hervor, die aus 4096 einzelnen Kraftkurven besteht. Der grüne Pfeil deutet auf den Zellkern, die blauen und gelben Pfeile zeigen auf den Zellrand. Über die gesamte Zelle spannen sich parallel ausgerichtete Aktin-Fasern (rote Pfeile).

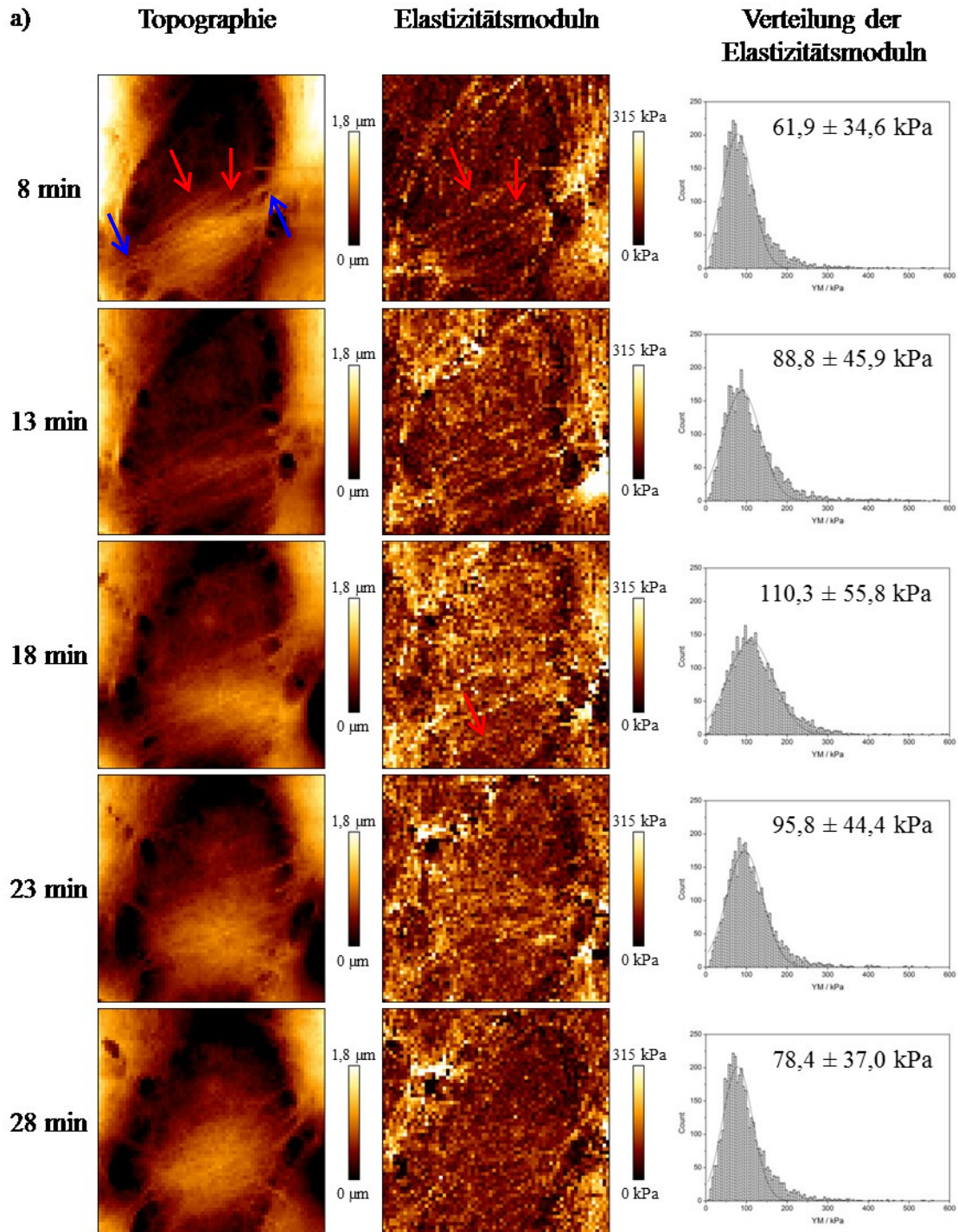
Die Messungen an den mit nsPEFs behandelten Zellen konnten nicht an exakt denselben Zellen aufgenommen werden wie die Messungen an den unbehandelten Zellen, da die Hochspannungspulse mit dem verwendeten Versuchsaufbau nicht unter dem AFM appliziert werden konnten. Somit konnten keine direkten Änderungen der Elastizitätsmoduln im Vergleich zu den unbehandelten Zellen bestimmt werden. Ein weiteres Problem stellte die Behandlung der Zellen bei Raumtemperatur dar, wodurch das Medium über den Zellen abkühlte. Unter dem AFM im PetriDishHeater, der auf 37 °C eingestellt war, erwärmte sich das Medium wieder. Der sukzessive Temperaturanstieg führte zu einer Drift des Laserstrahls, wodurch eine Messung erst möglich war, nachdem die Temperatur des Mediums annähernd konstant blieb, was erst nach etwa 8 min der Fall war. Eine Drift des Laserstrahls führt zu einer schrägen Baseline der aufgenommenen Kraftkurve. Da bei der Auswertung eine Baseline-Korrektur vorgenommen wurde, hatten leichte Temperaturänderungen jedoch kaum einen Einfluss auf das Ergebnis.

3.8.1 Zeitliche Entwicklung der Elastizitätsmoduln

Wie die Immunfluoreszenz-Färbung von Aktin zeigte (Abb. 3.14), führte die Behandlung der WB-F344 Monolayer zu einer Umstrukturierung des Aktin-Zytoskeletts. Das Zytoskelett ist maßgeblich für die Stabilität einer Zelle verantwortlich. Um festzustellen, ob sich in Folge der Behandlung mit nsPEFs auch die Elastizität der Zellen geändert hatte, wurden die Elastizitätsmoduln der Zellen bestimmt. Dazu wurden Zeitreihen zwischen 8 und

3 Ergebnisse

28 min nach dem Applizieren von 20 Pulsen mit einer Feldstärke von 20 kV/cm aufgenommen, die den Verlauf der Elastizitätsänderungen zeigen. Es wurde auch eine Zeitreihe eines unbehandelten Monolayers aufgenommen, um ausschließen zu können, dass sich die Zell-elastizität aufgrund der mechanischen Beanspruchung durch die Messung oder generell den Bedingungen des Untersuchungsprotokolls geändert hatte.



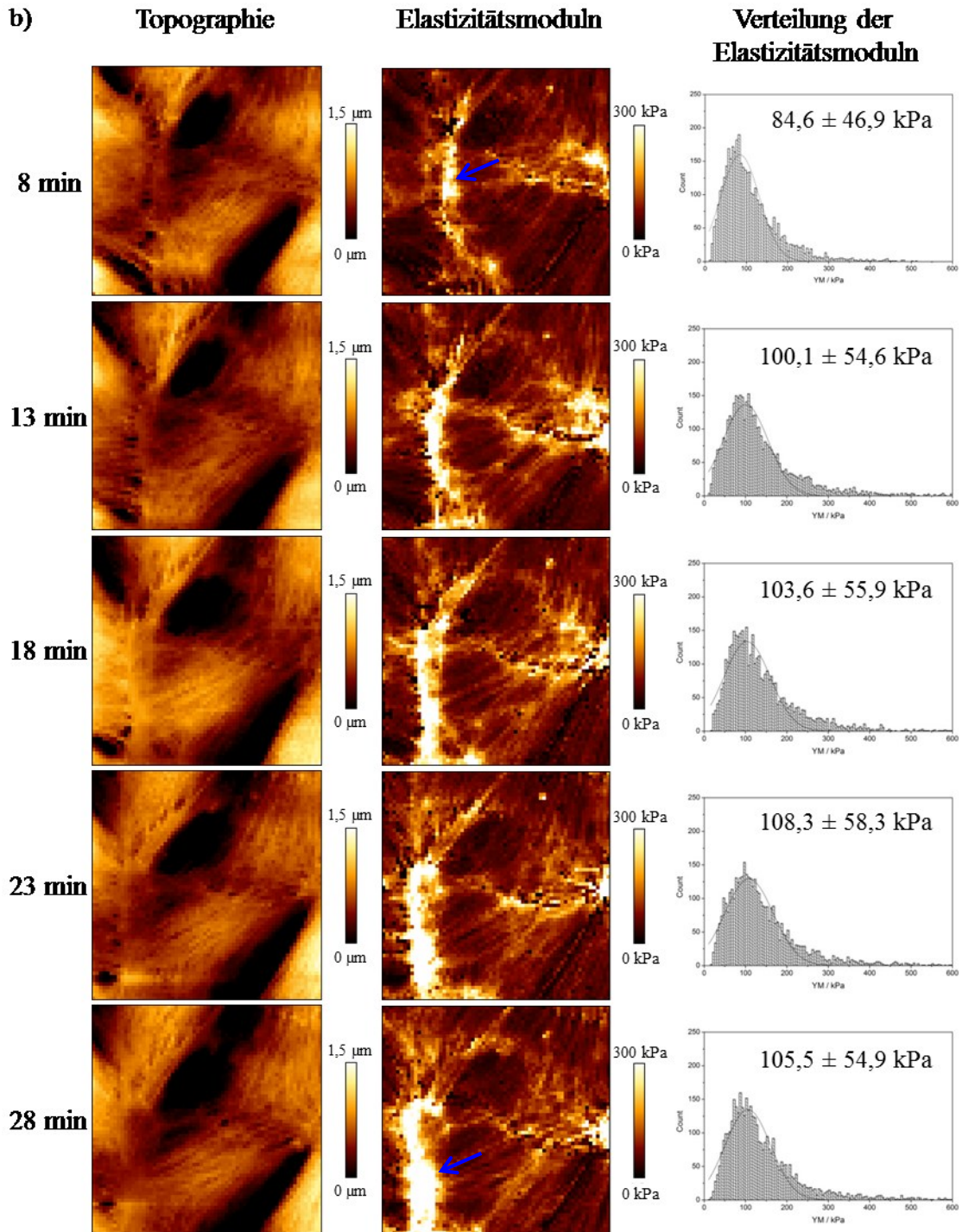


Abb. 3.22 AFM-Aufnahmen der Topographie (linke Spalte) und der Elastizitätsmoduln (mittlere Spalte) eines WB-F344 Monolayers nach der Behandlung mit 20 Pulsen mit einer Feldstärke von 20 kV/cm (a), und zum Vergleich an einem unbehandelten Monolayer (b). Die Aufnahmen wurden zwischen 8 und 28 min (in 5 min-Abständen) nach dem Applizieren der Pulse gemacht. Die rechte Spalte zeigt die Verteilung der Elastizitätsmoduln, über die eine Gauß-Funktion gefittet wurde (x-Achse: YM / x_{\max} : 600 kPa; y-Achse: counts / y_{\max} : 250). In den Histogrammen sind zusätzlich die Peak-Werte der Gauß-Kurven \pm SD (berechnet aus den Halbwertsbreiten der Kurven) angegeben.

Abb. 3.22a zeigt ein Beispiel einer mit dem AFM aufgenommenen Zeitreihe der Oberflächen-Topographie (linke Spalte) und der Elastizitätsmoduln (mittlere Spalte) eines mit nsPEFs (20 Pulse, 20 kV/cm) behandelten WB-F344 Monolayers. Zusätzlich sind die Verteilungen der Elastizitätsmoduln abgebildet, die mit einer Gauß-Funktion gefittet wurden, zusammen mit den Peak-Werten der Gauß-Fits und der zugehörigen Standardabweichung, die über die Halbwertsbreiten der Gauß-Glockenkurven berechnet wurden (rechte Spalte). Zum Vergleich zeigt Abb. 3.22b die Zeitreihe einer AFM-Messung an einem unbehandelten WB-F344 Monolayer.

Die topographischen Aufnahmen des behandelten Monolayers (Abb. 3.22a, linke Spalte) zeigen eine deutliche Veränderung der Zellen mit der Zeit. Bis 13 min nach der Behandlung sind wohldefinierte, parallel ausgerichtete Aktinfasern (rote Pfeile) zu erkennen, die sich über die komplette Zelle spannen. Zwischen 18 und 28 min nach dem Applizieren der Hochspannungspulse änderte sich die Form der Zelle deutlich, sie wurde wesentlich runder. Zudem sind kaum noch Aktinfasern zu erkennen, die sich über die gesamte Länge der Zelle erstrecken. Die Aktinfasern scheinen in Bruchstücke zerfallen zu sein und die „Pole“ der Zelle (blaue Pfeile) sich aufgelöst zu haben. Diese Veränderungen sind auch in den Abbildungen der Elastizitätsmoduln (Abb. 3.22a, mittlere Spalte) deutlich ersichtlich. 8 min nach dem Applizieren der Hochspannungspulse sind die Aktinfasern noch weitestgehend intakt und die Zellstruktur und -form gut erkennbar. Ab 13 min nach der Behandlung der Zellen mit nsPEFs wird die Verteilung der Elastizitätsmoduln immer diffuser, d.h. es sind kaum noch Aktinfasern zu erkennen und auch die Zellränder sind nur noch schwer auszumachen. Zwischen 18 und 28 min nach dem Anlegen der Hochspannungspulse ist anhand der Abbildung der Elastizitätsmoduln keine Zellstruktur mehr ersichtlich. Diese Entwicklung korreliert mit der Verteilung der Elastizitätsmoduln (Abb. 3.22a, rechte Spalte). 8 min nach Behandlung waren die Zellen in der beschriebenen Beispielmessung mit einem Mittelwert der Gauß-Kurven-Peaks von knapp 62 kPa eher weich. Bis 18 min nach dem Applizieren der Hochspannungspulse stieg dieser Wert auf 110 kPa, die Zellen wurden also steifer, bevor er anschließend wieder auf knapp 80 kPa absank. Auch die Halbwertsbreiten der Gauß-Fits über die Verteilung der Elastizitätsmoduln änderten sich deutlich. 8 min nach der nsPEF-Behandlung war die Verteilung mit einer Standardabweichung von knapp 35 kPa eher schmal, während sie zu 18 min hin immer breiter wurde und einen Wert von etwa 55 kPa erreichte. Das Ergebnis der letzten Messungen nach 28 min war mit einer Standardabweichung von 37 kPa ähnlich dem Ergebnis der ersten Messung.

Im Vergleich zu den behandelten Zellen zeigte die gemessene Zeitreihe der unbehandelten Zellen kaum eine Veränderung, weder in der Topographie noch in der Entwicklung der Elastizitätsmoduln. In allen Bildern ist die Zellstruktur mit den wohldefinierten, parallel ausgerichteten Aktinfasern zu erkennen. Auch die Elastizitätsmoduln (mittlere Spalte) ändern sich kaum, lediglich der steife Bereich am linken Zellrand (blauer Pfeil) wird mit der Zeit etwas größer. Diese Entwicklung ist auch an der Verteilung der Elastizitätsmoduln (rechte Spalte) erkennbar, deren Durchschnittswert von ca. 85 kPa auf etwa 105 kPa ansteigt. Im Unterschied zu den mit nsPEFs behandelten Zellen waren die Halbwertsbreiten der Gauß-Fits über die gesamte Messreihe weitestgehend konstant geblieben, mit Werten für die Standardabweichung zwischen 47 und 55 kPa.

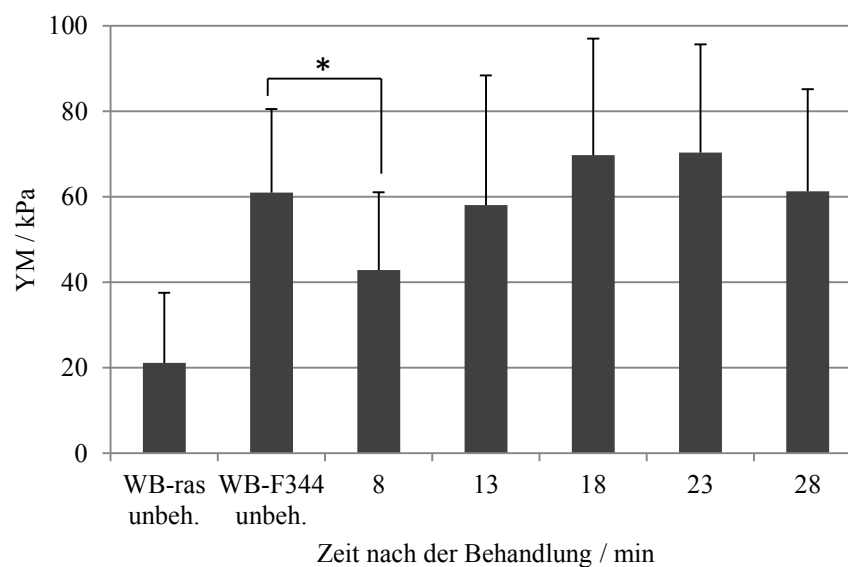


Abb. 3.23 Zeitlicher Verlauf der Youngschen Moduln von WB-F344 Zellen nach dem Applizieren von 20 Pulsen mit einer Feldstärke von 20 kV/cm im Vergleich zu unbehandelten WB-F344 und WB-ras Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte der Gauß-Kurven-Peaks \pm SD von sieben gemessenen Zeitreihen. (WB-F344 ctrl: n = 14; WB-ras ctrl: n = 5). Die Signifikanzen wurden mithilfe eines ungepaarten t-Tests ermittelt, mit einer Signifikanz von $p < 0,05$ (*).

Insgesamt wurde der zeitliche Verlauf der Elastizitätsmoduln an sieben verschiedenen WB-F344 Monolayern nach dem Applizieren von 20 Pulsen mit einer Feldstärke von 20 kV/cm aufgenommen. Die Werte für die Kontrollen wurden aus 14 (WB-F344) bzw. 5 (WB-ras) Messungen bestimmt. Abbildung 3.23 zeigt die aus diesen Messungen resultierenden Mittelwerte der Gauß-Kurven-Peaks im Vergleich zu den Werten von unbehandelten WB-

F344 und WB-ras Zellen. Die Fehlerbalken entsprechen den Mittelwerten der Standardabweichungen, die für jede Messung aus der Halbwertsbreite der Gauß-Kurven-Fits bestimmt wurden. Für die Auswertung wurden alle Werte von jeweils der kompletten Aufnahme verwendet.

Die unbehandelten WB-F344 Zellen hatten einen mittleren Elastizitätsmodul von etwa 61 kPa. Die Messung der Zellen 8 min nach der Behandlung mit nsPEFs zeigte, dass die Zellen mit einem mittleren Elastizitätsmodul von knapp 43 kPa im Vergleich signifikant weicher geworden waren. Bereits 13 min nach dem Applizieren der Hochspannungspulse lag der Elastizitätsmodul mit 58 kPa nur noch knapp unter dem Wert der Kontrolle. Die Messungen 18 und 23 min nach der nsPEF-Behandlung der Monolayer zeigten sogar eine leichte Erhöhung der Elastizitätsmoduln im Vergleich zur Kontrolle, auf einen Wert von etwa 70 kPa. Dieser Unterschied ist jedoch statistisch nicht signifikant. Bei der letzten Messung nach 28 min wiesen die Zellen wieder annähernd die gleiche Elastizität wie die unbehandelte Kontrolle auf (ca. 61 kPa). Im Vergleich dazu waren die tumorigenen WB-ras Zellen generell wesentlich weicher. Mit ca. 20 kPa war der mittlere Elastizitätsmodul der unbehandelten Tumorzellen nur etwa ein Drittel so hoch wie der der unbehandelten WB-F344 Zellen und nur etwa halb so hoch der der behandelten WB-F344 Zellen 8 min nach dem Applizieren der Hochspannungspulse.

3.8.2 Vergleich der Elastizität über dem Zellkern und dem Zellrand

Die Elastizitätsmoduln der Zellen variieren stark und hängen unter anderem von der Zelldichte im Monolayer ab. Um zu untersuchen, ob die Hochspannungspulse unterschiedliche Effekte auf verschiedene Bereiche der Zelle haben, wurden die Elastizitätsmoduln separat über dem Zellkern und dem Zellrand bestimmt. Dazu wurden dieselben Messungen verwendet, die bereits im vorhergehenden Kapitel beschrieben wurden. Es wurden Ausschnitte von 25 x 25 Kraft-Abstands-Kurven über dem Kern bzw. dem Rand ausgewählt und ebenfalls mittels Gauß-Fits ausgewertet.

Die Ergebnisse der Elastizitätsuntersuchungen an WB-F344 Zellen, die mit 20 Pulsen mit einer Feldstärke von 20 kV/cm behandelt wurden, sind in Abb. 3.24 gezeigt. Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der Elastizitätsmoduln für Bereiche über dem Zellkern (Abb. 3.24a) und dem Randbereich von Zellen (Abb. 3.24b) im Vergleich zu den entsprechenden Bereichen von unbehandelten WB-F344 und WB-ras Zellen.

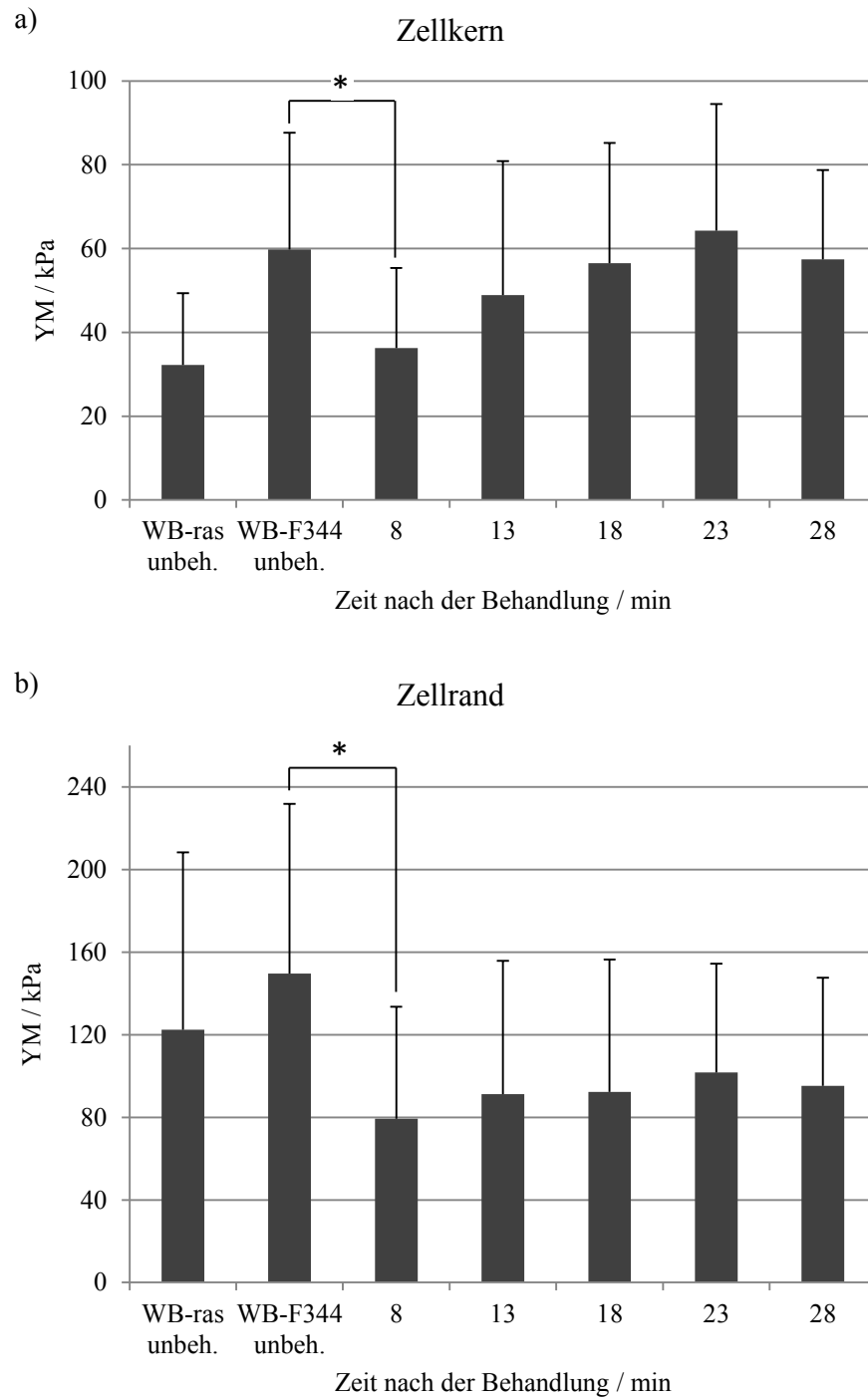


Abb. 3.24 Zeitlicher Verlauf der Youngschen Moduln im Bereich über dem Zellkern (a) bzw. dem Zellrand (b) von WB-F344 Zellen nach dem Applizieren von 20 Pulsen mit einer Feldstärke von 20 kV/cm im Vergleich zu unbehandelten WB-F344 und WB-ras Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte der Gauß-Kurven-Peaks \pm SD von sieben gemessenen Zeitreihen. (WB-F344 ctrl: $n = 14$; WB-ras ctrl: $n = 5$). Zu beachten sind die deutlich verschiedenen Skalen der y-Achse. Die Signifikanzen wurden mithilfe eines ungepaarten t-Tests ermittelt, mit einer Signifikanz von $p < 0,05$ (*).

Der mittlere Elastizitätsmodul von unbehandelten WB-F344 Zellen lag über dem Kern bei etwa 60 kPa. 8 min nach dem Applizieren der Hochspannungspulse sank die Elastizität signifikant um knapp die Hälfte auf 36 kPa, und stieg dann bis 23 min nach der Behandlung stetig auf einen Wert von 64 kPa. 28 min nach der nsPEF-Behandlung näherte sich der Elastizitätsmodul mit einem Wert von über 57 kPa wieder dem Kontrollniveau. Die Elastizität über dem Zellkern der tumorigenen WB-ras Zellen lag bei 32 kPa und war damit nur unwesentlich geringer wie die der WB-F344 Zellen 8 min nach dem Applizieren der nsPEFs. Im Vergleich dazu lagen die Elastizitätsmoduln von unbehandelten WB-F344 Zellen in den Bereichen über dem Zellrand bei knapp 150 kPa und die von unbehandelten WB-ras Zellen bei etwa 120 kPa. 8 min nach der nsPEF-Behandlung sank der mittlere Elastizitätsmodul signifikant um fast die Hälfte auf 80 kPa. Im weiteren Verlauf änderte sich die Elastizität über dem Rand kaum, war jedoch im Vergleich zur Kontrolle nicht mehr signifikant verändert. 13 min nach dem Applizieren der Hochspannungspulse betrug der Elastizitätsmodul ca. 91 kPa und nach 18 min 92 kPa. 23 min nach der nsPEF-Behandlung lag der Wert bei knapp über 100 kPa, bevor er anschließend wieder auf 95 kPa absank. Im Gegensatz zu der Elastizität über dem Zellkern erholte sie sich über dem Zellrand nicht mehr und lag auch eine halbe Stunde, nachdem die Zellen den elektrischen Pulsen ausgesetzt waren, deutlich unterhalb des Kontrollwertes.

3.8.3 Zusammenhang von Elastizität und Zytoskelett

Wie im vorhergehenden Kapitel beschrieben, sind tumorigene Zellen deutlich weicher als nicht-tumorigene Zellen. Da die Elastizität von Zellen maßgeblich durch das Zytoskelett bestimmt wird, wurde zum Vergleich zu den AFM-Aufnahmen auch das F-Aktin in WB-F344 und WB-ras Monolayern angefärbt (Abb. 3.25).

In den AFM-Aufnahmen der WB-F344 Zellen sind sowohl in der topographischen Darstellung als auch in der Abbildung der Elastizitätsmoduln deutlich zahlreiche, parallel verlaufende Aktinfasern zu erkennen, die sich über die gesamte Zelle erstrecken (rote Pfeile). Auch die Immunfluoreszenzfärbung des F-Aktin zeigt klar definierte Aktinfasern, die über die gesamte Zelle gespannt sind. Im Gegensatz dazu unterscheiden sich sowohl die AFM-Aufnahmen als auch die Immunfluoreszenzfärbung des WB-ras Monolayers stark von denen des WB-F344 Monolayers. Die Farbcodierung der AFM-Aufnahmen zeigt, dass die Tumorzellen im Vergleich zu den normalen Zellen deutlich höher, gleichzeitig jedoch wesentlich weicher sind. Die Maximalwerte für die WB-F344 Zellen betragen

knapp 960 nm bzw. 600 kPa, während die WB-ras Zellen Werte von 3,45 μm und 344 kPa erreichen. Im Fall der tumorigenen WB-ras Zellen sind weder in der Topographie noch in der Abbildung der Elastizitätsmoduln definierte Aktinfasern erkennbar. Dieses Ergebnis korreliert mit der Immunfluoreszenzfärbung. Die Färbung des F-Aktin in den WB-ras Zellen zeigt keine klar erkennbaren Aktinfasern, sondern weist vielmehr ein diffuses Fluoreszenzsignal im Zellinneren auf. Auch die Umrisse der Tumorzellen sind in der Immunfluoreszenzfärbung nicht so deutlich begrenzt wie im Fall der WB-F344 Zellen (gelbe Pfeile). Im Vergleich dazu waren die Aktinfasern in WB-F344 Zellen nach der Behandlung mit nsPEFs in Bruchstücke zerfallen. Die Umstrukturierung war auch 28 min nach der Behandlung noch zu erkennen (s. Kap. 3.5, Abb. 3.14).

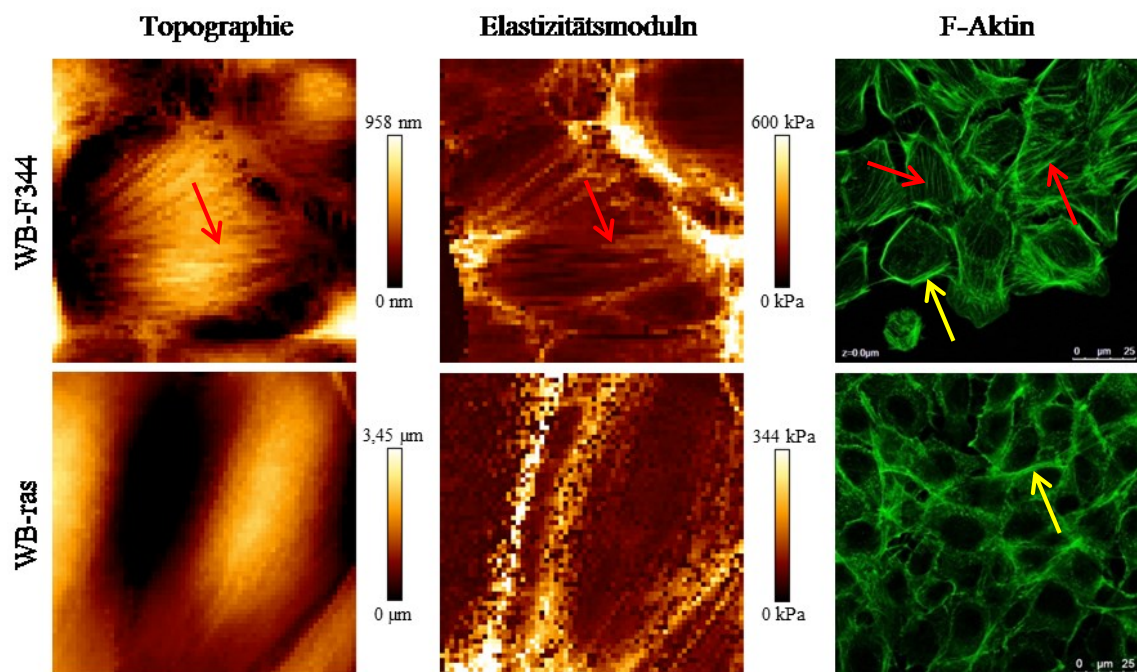


Abb. 3.25 AFM-Aufnahmen der Topographie (linke Spalte) und der Elastizitätsmoduln (mittlere Spalte) eines unbehandelten WB-F344 Monolayers (obere Reihe) und eines WB-ras Monolayers (untere Reihe). Zum Vergleich dazu zeigt die rechte Spalte die Immunfluoreszenzfärbung des Aktinzytoskeletts. Die roten Pfeile weisen auf Aktinfasern, die gelben auf den Zellrand.

3.9 Effekte von nsPEFs auf Kanzerogenese und Invasivität von Zellen

Die Ergebnisse zur Behandlung der Zellen mit nsPEFs zeigen, dass diese sowohl eine Inhibierung der ZZZK als auch eine Verminderung der Zellelastizität zur Folge haben. Beides wird mit Kanzerogenität und Invasivität assoziiert (s. Kap. 1.2.3 und 1.3). Um zu überprüfen, ob mit nsPEFs behandelte Zellen tumorigene Eigenschaften entwickeln, wurde zum

einen ein Scratch Assay durchgeführt, um die Proliferation und die Migrationsgeschwindigkeit von mit nsPEFs behandelten Zellen im Vergleich zu unbehandelten Zellen zu untersuchen. Zum anderen wurde ein Soft Agar Colony Formation Assay gemacht, der Hinweise auf eine maligne Transformation der Zellen gibt.

3.9.1 Migration und Proliferation

Abbildung 3.26 zeigt die Mikroskopie-Aufnahmen eines unbehandelten WB-F344 Monolayers zu Anfang, also direkt nach dem Setzen des Kratzers, (a) und zum Ende des Scratch Assays (nach 24 h) (b). Die Doppelpfeile beschreiben die ausgemessenen Spaltbreiten, die für die in Kap. 2.12 beschriebene Auswertung benötigt wurden, bei der der Anteil des zugewachsenen Spaltes bestimmt wurde.

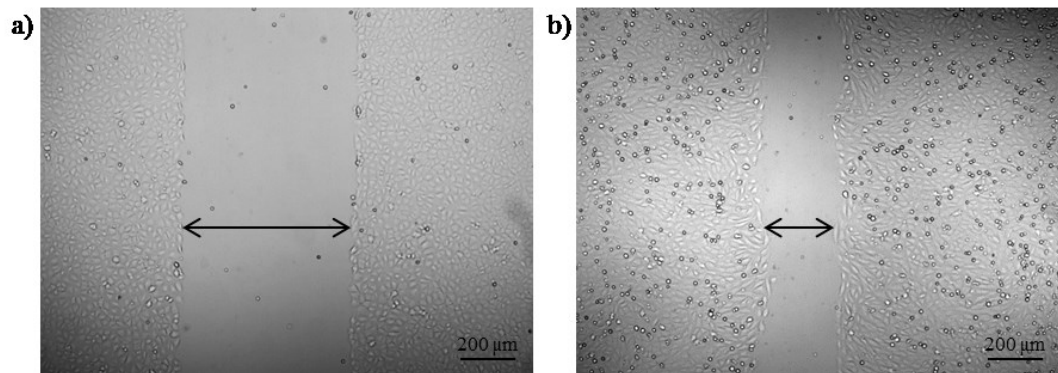


Abb. 3.26 Scratch Assay durchgeführt an einem unbehandelten WB-F344 Monolayer. Gezeigt sind die Mikroskopie-Aufnahmen des Kratzers zu Anfang (a) und nach 24 h des Scratch Assays (b).

Das Ergebnis des Scratch Assays ist in Abb. 3.27 dargestellt. Es wurde das Zuwachsen des Spaltabstandes von unbehandelten WB-F344 und WB-ras Zellen mit dem von WB-F344 Zellen verglichen, die mit 20 Pulsen und einer Feldstärke von 15 bzw. 20 kV/cm behandelt worden waren. In den ersten 15 Stunden nach dem Setzen des Kratzers war der Spalt in den WB-ras Monolayern wesentlich schneller zugewachsen als in den WB-F344 Monolayern. Zudem war im Fall der WB-F344 Monolayer bis zu diesem Zeitpunkt kaum ein Unterschied zwischen behandelten und unbehandelten Zellen festzustellen. 2,5 h nach dem Applizieren der Hochspannungspulse war der Spalt der behandelten sowie der unbehandelten Zellen jeweils um ca. 6,5 % zugewachsen, während sich der Spaltabstand zwischen den Tumorzellen zu diesem Zeitpunkt bereits um über 11 % verkleinert hatte. Nach 5 h war das Zellwachstum von allen WB-F344 Zellen weiterhin gleich, in allen drei Fällen war der Spalt um etwa 15 % im Vergleich zum ursprünglichen Kratzer zugewachsen. Im Gegensatz

dazu war der Spalt in den WB-ras Monolayern zu diesem Zeitpunkt bereits um über 23 % zugewachsen. Dieser Unterschied zwischen den WB-F344 und den WB-ras Zellen blieb auch 7,5 h nach der nsPEFs-Behandlung bestehen. Der Spalt in den WB-ras Zellen war um mindestens 5 % mehr zugewachsen als der in den WB-F344 Zellen. Ab 10 h nach Beginn des Scratch Assays wurde der Wachstumsvorsprung der WB-ras Zellen kleiner und betrug maximal noch etwa 3 %, ab 12,5 h waren es noch ca. 2 %.

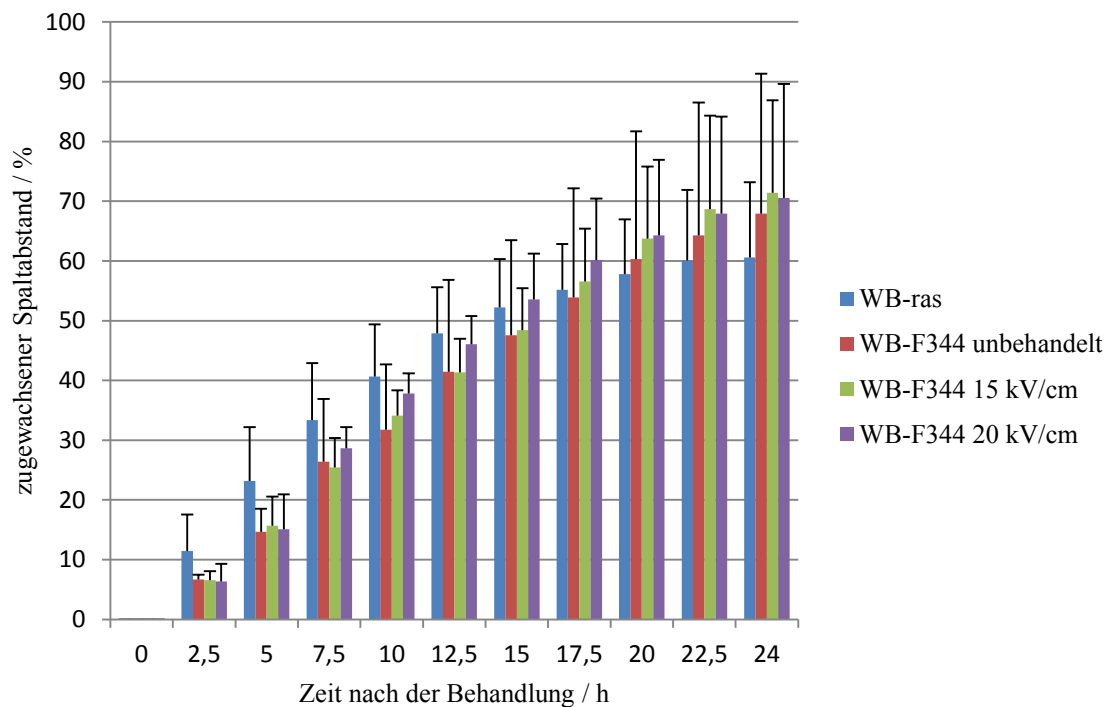


Abb. 3.27 Analyse des Scratch Assays von WB-F344 Zellen, die mit 20 Pulsen mit Feldstärken von 15 und 20 kV/cm behandelt wurden, im Vergleich zu unbehandelten WB-F344 und WB-ras Zellen. Dargestellt ist der zugewachsene Anteil des Spaltes prozentual im Vergleich zur ursprünglichen Spaltbreite als Mittelwert aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten \pm SD.

In den ersten 15 h schloss sich der Spalt in den mit 20 kV/cm behandelten Monolayern nur unwesentlich schneller im Vergleich zu den mit 15 kV/cm behandelten und den unbehandelten WB-F344 Zellen. In der Zeit zwischen 15 h und 24 h nach Beginn des Assays schien die Proliferation und Migration der WB-ras Zellen zu stagnieren, der Spalt wuchs in dieser Zeit nur noch um 8 % weiter zu. Im Mittel war der ursprüngliche Kratzer in den WB-ras Monolayern nur um 60 % zugewachsen. Der Spalt in den WB-F344 Zellen hingegen wuchs auch in der Zeit zwischen 15 h und 24 h nach Beginn des Assays stetig weiter zusammen, wobei es kaum einen Unterschied machte, ob die Zellen zuvor behandelt worden waren oder nicht, und gleich mit welcher Feldstärke. Am Ende des Scratch Assays waren

die Kratzer in den WB-F344 Monolayern im Mittel um ungefähr 70 % zusammengewachsen. Eine Behandlung mit nsPEFs scheint also keinen Einfluss auf die Migration und Proliferation von WB-F344 Zellen zu haben.

3.9.2 Maligne Transformation

Des Weiteren wurde ein Soft Agar Colony Formation Assay durchgeführt, mit dem untersucht wurde, ob nsPEF-behandelte Zellen in der Lage sind verankerungsunabhängig zu wachsen, was auf eine maligne Transformation der Zellen hindeuten würde (s. Kap. 2.13).

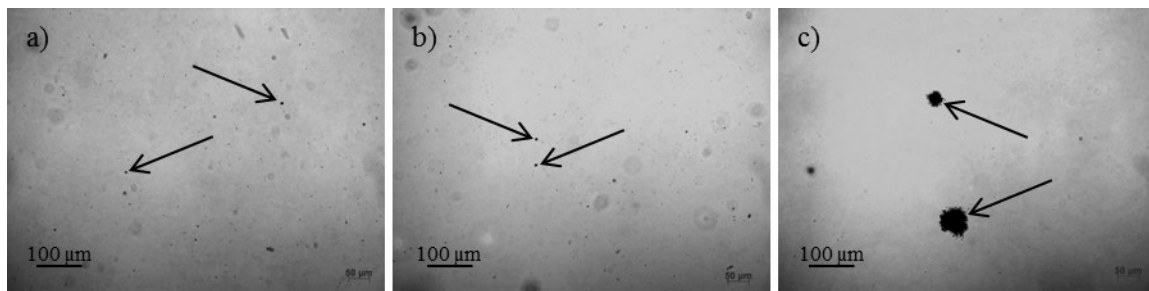


Abb. 3.28 Mikroskopie-Aufnahmen des Soft Agar Colony Formation Assays von WB-F344 Zellen, die mit 20 kV/cm behandelt wurden (a), und von unbehandelten WB-F344 (b) und WB-ras Zellen (c). Die Pfeile in a) und b) zeigen auf einzelne Zellen, während sich in c) deutlich erkennbar Kolonien gebildet haben. (n = 3)

Abbildung 3.28 zeigt die Mikroskopie-Bilder, die drei Wochen nach Beginn des Assays aufgenommen wurden. Neben WB-F344 Zellen, die mit 20 Pulsen und einer Feldstärke von 20 kV/cm behandelt worden waren (Abb. 3.28a), sind zum Vergleich unbehandelte WB-F344 (Abb. 3.28b) und WB-ras Zellen (Abb. 3.28c) abgebildet. Alle Aufnahmen wurden mit derselben Vergrößerung aufgenommen. Weder im Fall der behandelten noch der unbehandelten WB-F344 Zellen waren Kolonien gewachsen. Die Pfeile zeigen auf mit Giemsa gefärbte Zellen, die zwar im Agar überlebt hatten, jedoch nicht proliferierten. Im Gegensatz dazu konnten die WB-ras Zellen auch verankerungsunabhängig im Agar wachsen und hatten deutlich erkennbar Kolonien gebildet (Pfeile Abb. 3.28c).

Der Soft Agar Colony Formation Assay wurde zusätzlich mit WB-F344 Zellen durchgeführt, die zuvor mit 20 bzw. 100 Pulsen und Feldstärken von jeweils 10 und 15 kV/cm behandelt worden waren. Keine der behandelten Gruppen bildete Kolonien aus (Daten nicht gezeigt).

4 Diskussion

4.1 Vergleich idealer und realer Hochspannungspuls

Zur Behandlung der Zellen unter gut definierten Bedingungen, d.h. mit einem konstanten elektrischen Feld, sollten idealerweise Rechteckpulse mit einer unendlich kurzen Anstiegszeit verwendet werden. Wie die Abbildung eines typischen, mit dem Wellenleitungspuls-generator generierten Pulses zeigt (Abb. 3.1), entsprach die Dauer des Hochspannungspulses der gewünschten Länge von 100 ns mit einer relativ kurzen Anstiegszeit von etwa 13 ns und die ausgegebene Spannung kam in etwa der über die Spannungsquelle angelegten Spannung gleich. Dennoch wich die reale Pulsform von der idealen ab. Es kam aufgrund von Reflektionen zu zusätzlichen Pulsen, die wie bereits in Kap. 3.1 beschrieben durch eine nicht exakte Impedanzanpassung der Last an die Pulsgeneratorimpedanz entstehen. In diesem Fall war der Lastwiderstand, also der von Zellen und Medium, etwas kleiner als die Impedanz des Pulsgenerators. Die Anpassung der Last könnte verbessert werden, indem der Blumlein-Generator mit zwei in parallel betriebenen Kabeln aufgebaut werden würde, wodurch sich die Impedanz des Pulsgenerators halbieren und sich dem Lastwiderstand annähern würde. Im Fall eines zu hohen Lastwiderstands könnte die Impedanz durch einen zusätzlichen, zur Last parallel geschalteten Widerstand exakt angepasst werden.

Die Amplituden der zusätzlichen Pulse sind allerdings wesentlich kleiner als die des Hauptpulses und zudem in der Amplitude schnell abnehmend (Abb. 3.2). Wie die Ergebnisse zur Zellvitalität zeigen (Abb. 3.5), ist für diese geringen Spannungen, bzw. für die entsprechenden elektrischen Felder, kein wesentlicher oder nachhaltiger Einfluss auf die Zellen zu erwarten, so dass sich die beobachteten Effekte tatsächlich auf den Hauptpuls zurückführen lassen. Verstärkungen der biologischen Effekte durch die zusätzlichen Pulse können jedoch nicht vollständig ausgeschlossen werden.

Die Simulation der elektrischen Feldstärkeverteilung (Abb. 3.3) zeigt, dass das Feld aufgrund der Elektrodenkonfiguration nicht völlig homogen ist und die Feldstärke zwischen den Elektroden um ca. 2 kV/cm variiert. Auch der reale Puls hatte nicht die Form eines perfekten Rechteckpulses. Im Bereich des Amplituden-Plateaus lagen die Schwankungen bei der höchsten angelegten Spannung von 10 kV bei etwa ± 2 kV. Für die Versuche wurde die Feldstärke in Schritten von 5 kV/cm geändert. Die Variation der Feldstärke, die durch

die Elektrodengeometrie bzw. die nicht exakte Impedanzanpassung von Last- und Pulsgeneratorwiderstand entstanden ist, war also geringer als die gewollte schrittweise Änderung der Feldstärke in den Versuchen und somit im Hinblick auf die Zellvitalität vernachlässigbar.

4.2 Zellvitalität und Elektroporation

Wie die Ergebnisse des MTT-Tests (Abb. 3.5) zeigen, wiesen die tumorigenen WB-ras im Vergleich zu den WB-F344 Zellen eine geringere Sensitivität gegenüber der Behandlung mit nsPEFs auf. Dies könnte sich darauf zurückführen lassen, dass die Versuche an den beiden Zelllinien in unterschiedlich zusammengesetzten Zellkulturmedien durchgeführt wurden. So konnte bereits in einer Studie gezeigt werden, dass das Überleben und die Membranintegrität von Zellen neben den Pulsparametern auch von den elektrischen Parametern der Zelle und des Mediums sowie der Zusammensetzung des Mediums abhängt. Dabei spielen vor allem Calcium und Magnesium eine wichtige Rolle, die die Zellmembran vor einer anhaltenden Schädigung schützen [152-154]. Da für die Zellen keine Elektroporation nachgewiesen werden konnte, ist es eher unwahrscheinlich, dass die den Medien zugesetzten Inhaltsstoffe einen direkten toxischen Effekt auf die Zellen hatten. Beide Medien enthalten dieselbe Konzentration an Magnesium, jedoch nicht dieselbe Menge an Calcium. Während das Medium für die normalen WB-F344 Zellen 1,8 mM Calcium enthielt, waren in dem CCD-Medium für die tumorigenen WB-ras Zellen nur 1,36 mM Calcium enthalten. Zudem waren die Leitfähigkeiten der beiden Zellkulturmedien mit knapp 14 mS für das normale und 15,6 mS für das CCD-Medium leicht verschieden. Eine höhere Leitfähigkeit führt zu einer schnelleren Änderung des Transmembranpotentials und somit einem schnelleren Erreichen des Elektroporations-Schwellenwertes und letztendlich dem schnelleren Abtöten der Zellen [152]. Betrachtet man nur die Zellkulturmedien, in denen die Zellen behandelt wurden, müssten also mehr WB-F344 als WB-ras Zellen die nsPEF-Behandlung überlebt haben, was jedoch nur für eine Feldstärke bis 20 kV/cm zutrif. Ab 25 kV/cm überlebten wesentlich mehr Tumorzellen als normale Zellen die nsPEF-Behandlung. Man könnte vermuten, dass ab dieser Feldstärke eine Art Schwellwert überschritten wurde, ab dem die Zusammensetzung des Mediums keinen entscheidenden Einfluss mehr auf die Vitalität der Zellen hatte, und die Ursache für die unterschiedliche Sensitivität der beiden Zelllinien an den Zellen selbst lag. Bisherige Studien zeigten allerdings immer den umgekehrten Fall, dass Tumorzellen sensibler auf nsPEFs reagieren als normale Zellen

[155, 156]. Die Gründe für die unterschiedliche Ansprechbarkeit der beiden Zelllinien bleiben somit im Rahmen dieser Studie zunächst ungeklärt.

Das Überleben der Zellen wurde mittels MTT-Test untersucht, der auf der Messung der metabolischen Aktivität von Zellen beruht (s. Kap. 2.4). Dabei dient die Menge des durch Glykolyse umgesetzten Farbstoffs MTT als Maß für die Zellvitalität. Genau genommen wird also nicht der Anteil der lebenden Zellen, sondern lediglich die Enzymaktivität der Zellen bestimmt. Diese muss aber nicht zwangsläufig mit dem Anteil der lebenden Zellen korrelieren. So könnte es sein, dass ein Teil der Zellen abgestorben ist, die überlebenden Zellen jedoch einen erhöhten Stoffwechsel haben, was zu der Schlussfolgerung führen würde, dass mehr Zellen die Behandlung überlebt haben als es tatsächlich der Fall war. Umgekehrt könnten die Hochspannungspulse auch zu einer Verminderung der metabolischen Aktivität geführt haben, was den umgekehrten Schluss nahelegen würde, dass weniger Zellen die Behandlung überlebt haben als es tatsächlich der Fall war. Diese These, dass nsPEFs die Enzymaktivität beeinflussen können, würde auch mit den Ergebnissen zum Überleben der Zellen korrelieren. Betrachtet man das Diagramm in Abb. 3.5 zusammen mit den Fehlerbalken, stieg die Enzymaktivität im Fall der WB-F344 Zellen nach der Behandlung der Zellen mit einer Feldstärke von 10 bzw. 15 kV/cm auf über 110 % im Vergleich zur Kontrolle an, im Fall der WB-ras Zellen für eine applizierte Feldstärke von 5 kV/cm sogar auf 120 %. Da nicht plötzlich mehr Zellen im Well vorhanden sein können, muss sich folglich die metabolische Aktivität der Zellen erhöht haben.

Der sprunghafte Anstieg der Enzymaktivität im Fall der WB-ras Zellen bei 25 kV/cm könnte darauf zurückzuführen sein, dass sich die Tumorzellen, im Gegensatz zu den WB-F344 Zellen, viel schneller von der Substratoberfläche ablösten. Bereits das Ablösen von sehr kleinen Teilen des Monolayers änderte die gemessenen Absorptionswerte signifikant. Deshalb weisen vor allem die Werte für die Enzymaktivität der WB-ras Zellen einen relativ großen Fehlerbalken auf.

Des Weiteren können elektrochemische Effekte auf die Zellvitalität ausgeschlossen werden. Die Zellen wurden zusammen mit dem MTT-Farbstoff für zwei Stunden inkubiert. Hätten sich reaktive Spezies gebildet, hätten sich diese während der Inkubation im gesamten Well verteilt und auf alle Zellen ausgewirkt. Die Effekte beschränkten sich jedoch auf die Zellen zwischen den Elektroden (s. Abb. 3.4).

Die mögliche Bildung von Poren in der Plasmamembran wurde über die Aufnahme von PI in die Zelle überprüft, das eine Molekülgröße von ca. 660 Da hat. Jedoch kann, gerade bei einer wie für die vorliegende Arbeit verwendeten Pulslänge im Bereich von Nanosekunden,

nicht ausgeschlossen werden, dass es zur Nanoporation, also zur Bildung sehr kleiner Poren kommt, die zwar kein PI, dafür aber wesentlich kleinere Moleküle wie z.B. Ca^{2+} (40 Da) durchlassen [157]. Diese Möglichkeit wurde nicht weiter untersucht, da Nanoporation keinen Einfluss auf die Ergebnisse zur ZZK hat.

4.3 Zell-Zell-Kommunikation

In der vorliegenden Arbeit wurde zum ersten Mal der Einfluss von Nanosekunden gepulsten elektrischen Feldern auf die Gap Junction vermittelte Kommunikation zwischen Zellen beschrieben. Dass elektrische Felder überhaupt einen Einfluss auf die ZZK haben können, wurde bereits an prä-osteoplastischen MC3T3-E1 Zellen gezeigt, die extrem niederfrequenten elektromagnetischen Feldern ausgesetzt wurden, die eine Inhibierung der ZZK bewirkten [158]. Ein anderes Beispiel ist die Behandlung von Brustkrebszellen mit „Energie regulierbaren steilen Pulsen“, die zu einer Erhöhung der Cx43 Expression führten [159].

In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass die ZZK in WB-F344 Zellen, die Hochspannungspulsen mit einer Länge von 100 ns und Feldstärken zwischen 10 und 20 kV/cm ausgesetzt waren, Zeit- und Feldstärke-abhängig inhibiert wurde (Abb. 3.10). Da auch die Pulsanzahl einen Einfluss auf die in Zellen hervorgerufenen Effekte haben kann, wurden zum Vergleich auch Versuche mit 100 Pulsen (100 ns) und einer Feldstärke von 10 kV/cm hinsichtlich Vitalität und ZZK durchgeführt. Der MTT-Test ergab, dass die nsPEF-Behandlung mit diesen Parametern ähnlich viele Zellen überlebt hatten wie die Behandlung mit 20 Pulsen und 20 kV/cm. Das Ergebnis des Fluoreszenzfarbstoff-Transfer Assay bezüglich der ZZK war für 100 Pulse vergleichbar mit dem Applizieren von 20 Pulsen und einer Feldstärke von 15 kV/cm. Diese ähnlichen Resultate für unterschiedliche Pulszahlen bei gleicher Pulslänge können über den Energie-Eintrag in die Zellen erklärt werden, der mit folgender Formel berechnet werden kann [160]:

$$\Delta E = \sigma E^2 N \tau \quad (4.1)$$

mit der Pulslänge τ , der Leitfähigkeit des Mediums σ , der elektrischen Feldstärke E und der Pulszahl N . Da Pulslänge und Medium für beide Bedingungen gleich sind, unterscheidet sich der Energie-Eintrag lediglich aufgrund der Feldstärke und der Anzahl der Pulse. Vergleicht man die Anwendung von 100 Pulsen mit einer Feldstärke von 10 kV/cm mit der

von 20 Pulsen und 20 kV/cm, unterscheidet sich der Energie-Eintrag lediglich um einen Faktor 0,2, der hinsichtlich biologischer Effekte vermutlich vernachlässigbar ist.

Für den Effekt der Hochspannungspulse auf die ZZK kommen mehrere mögliche durch nsPEFs induzierte Mechanismen in Frage, wie z.B. eine Änderung des Membranpotentials oder die Aktivierung von MAP-Kinasen, die nachfolgend diskutiert werden.

4.3.1 Verteilung von Cx43 in den Zellen

In der bereits erwähnten Studie an den prä-osteoplastischen MC3T3-E1 Zellen, die extrem niederfrequenten elektromagnetischen Feldern von 0-15 G und 2,3279 mV/m bei 60 Hz ausgesetzt waren, war die ZZK während ihrer Proliferationsphase vermindert. Gleichzeitig blieb die Menge und Verteilung von Cx43 in den Zellen jedoch unverändert [158]. In der vorliegenden Arbeit zeigte die Immunfluoreszenzfärbung von Cx43 in den WB-F344 Zellen nach der Behandlung mit nsPEFs im Gegensatz dazu eine zeitabhängige Änderung der Cx43-Verteilung (Abb. 3.14), wobei der Zellzyklus hier allerdings nicht berücksichtigt wurde. 5 min nach dem Applizieren der Hochspannungspulse mit einer Feldstärke von 20 kV/cm war noch kaum eine Änderung der Cx43-Verteilung zu erkennen, jedoch schienen die GJ-Plaques im Vergleich zur Kontrolle bereits etwas kleiner zu sein. Die Ergebnisse der Färbung 15 und 30 min nach der nsPEF-Behandlung zeigten, dass immer mehr GJs abgebaut wurden, bis kaum mehr Cx43 in der Plasmamembran detektierbar war. Der Auf- und Abbau der GJ ist ein dynamischer Prozess, bei dem permanent neue GJs am Rand der Plaques in die Zellmembran eingebaut werden und die dann immer weiter zur Mitte wandern, von wo aus sie internalisiert und schließlich abgebaut werden [86, 87, 91]. Das Kleinerwerden der GJ-Plaques nach 5 min könnte darauf zurückzuführen sein, dass bereits nach dieser kurzen Zeit GJs abgebaut, aber keine neuen mehr aufgebaut wurden. Zudem nahm mit der Zeit auch das intrazelluläre Fluoreszenzsignal zu, je weniger GJs in der Membran nachweisbar waren. Der Abbau der GJs findet in Lysosomen statt. Die in den Lysosomen entstandenen Bruchstücke werden ins Zytosol abgegeben, wo sie als Bausteine für neue Moleküle dienen [161]. Im Zytoplasma waren während des Abbaus der GJs punktuelle Spots erkennbar, die den Lysosomen entsprechen könnten, sowie ein diffuses Fluoreszenzsignal, das von zum Recycling ins Zytoplasma abgegebenen Cx43 stammen könnte. Der Abbau der GJs vollzog sich innerhalb von 30 min. Da die Halbwertszeit der GJs normalerweise 1-3 h beträgt, kann der Abbau der GJs aus der Membran jedoch nicht alleine

über die natürliche *Turnover*-Rate erklärt werden. Vielmehr müssen die Hochspannungspulse einen weiteren, aktiven Prozess zum Abbau der GJs ausgelöst haben, wie z.B. die Aktivierung von MAP-Kinasen. 60 min nach dem Applizieren der Pulse war eine Rückkehr der GJs in die Plasmamembran erkennbar. Die Cx43-Verteilung korrelierte auf den ersten Blick nicht mit den Ergebnissen zur Untersuchung der ZZK. Demnach kommunizierten die Zellen 5 min nach der nsPEF-Behandlung mit 20 kV/cm noch zu 70 % im Vergleich zur Kontrolle, während das Cx43 in der Zellmembran zum gleichen Zeitpunkt jedoch kaum verändert war (s. Abb. 3.11).

Neben der Menge an GJs in der Membran spielt auch der funktionale Zustand, also ob die Kanäle geöffnet oder geschlossen sind, eine entscheidende Rolle. So könnte es sein, dass 5 min nach dem Applizieren der Hochspannungspulse zwar noch zahlreiche GJs in der Membran vorhanden waren, diese jedoch in einem geschlossenen Zustand vorlagen. Ähnlich ist die Situation 15 min nach der Behandlung. Obwohl offensichtlich noch GJ in der Membran nachweisbar waren, war die ZZK zu diesem Zeitpunkt komplett inhibiert. Nach 30 min waren fast keine GJs mehr in der Membran detektierbar, zu diesem Zeitpunkt hatte die ZZK allerdings bereits wieder begonnen, sich zu regenerieren. In diesem Fall könnte es sein, dass sich die wenigen vorhandenen GJs wieder öffneten und so den Austausch von Molekülen erlaubten. Zudem muss die Menge an vorhandenem Connexin nicht zwangsläufig mit der ZZK korrelieren [50]. 1 h nachdem die Monolayer den elektrischen Pulsen ausgesetzt waren, zeigte sich in der Immunfluoreszenzfärbung, dass wieder GJs zurück zur Membran transportiert wurden. Dies spiegelte sich auch in der ZZK wieder, die sich nach 60 min auf etwa 40 % im Vergleich zur Kontrolle erholt hatte.

4.3.2 Gen- und Proteinexpression von Cx43

Die mit nsPEFs behandelten WB-F344 Zellen wiesen bis zu einer Stunde nach dem Applizieren der 100 ns-Pulse eine signifikante Herunterregulierung des mRNA-Levels von Cx43 auf (Abb. 3.16). 3 h nach der Behandlung stieg die Genexpression für mit 20 kV/cm behandelte Zellen noch einmal fast auf Kontroll-Niveau an, bevor sie sich zu allen weiteren untersuchten Zeitpunkten (6, 24 und 48 h) auf einem annähernd gleichbleibenden Wert unterhalb der Kontrolle festsetzte. Der Anstieg nach 3 h könnte auf ein Entgegenregeln der Zellen zurückzuführen sein, die versucht haben, die veränderte Genexpression zu kompensieren, bevor sich der Wert dauerhaft auf einem Wert unterhalb der Kontrolle festzusetzen schien.

Ähnlich wie bei der ZZK schien die schrittweise Erhöhung der Feldstärke eine lineare Änderung der Cx43 Genexpression bewirkt zu haben. Die verminderte Cx43 Genexpression korrelierte mit der Änderung der Gesamtproteinmenge an Cx43, die 30 min nach der Behandlung ebenfalls signifikant reduziert war (Abb. 3.20). Im Gegensatz dazu steht eine Studie, in der Brustkrebszellen 5 min lang mit „Energie regulierbaren steilen Pulsen“ behandelt wurden. Die nach 48 h durchgeführten Protein- und Genanalysen zeigten eine Erhöhung der Cx43 Expression im Vergleich zur Kontrolle [159]. Die Genexpression kann unter anderem durch die Aktivierung von MAP-Kinasen reguliert werden. Diese können Serine und Threonine auf bestimmten Genregulatorproteinen phosphorylieren, was deren Fähigkeit zur Steuerung der Transkription der Zielgene ändert. Dabei hängt das genaue Ergebnis davon ab, welche anderen Gene in der Zelle aktiv sind und welche Signale die Zelle noch erhält [18]. Dies würde erklären, warum die Genexpression in unterschiedlichen Zelltypen unterschiedlich durch denselben Stimulus verändert sein kann.

Normalerweise dauert es mehrere Stunden, bis sich die Genexpression von Zellen ändert. Nach der Behandlung der WB-F344 Zellen mit nsPEFs änderte sie sich jedoch bereits innerhalb von 30 min. Im Vergleich zu Zellen, die über einen längeren Zeitraum elektrischen Feldern von wesentlich geringerer Feldstärke ausgesetzt waren, wie es in der Studie mit den Brustkrebszellen der Fall war [159], könnte man vermuten, dass nsPEFs einen direkten Effekt auf die Zellen haben, der zu einer sehr schnellen Minderung der Gen- und Proteinexpression von Cx43 führen kann.

Die verminderte Cx43 Expression stimmte mit den Ergebnissen der Immunfluoreszenzfärbung überein. Neben dem Abbau der GJs aus der Plasmamembran könnte zusätzlich die geringere Menge an zur Verfügung stehendem Cx43 den Aufbau von neuen GJs erschwert haben. Aus demselben Grund könnte man entsprechend der herabgesetzten Genexpression von Cx43 auch eine verringerte ZZK erwarten. Jedoch müssen Gen- und Proteinexpression nicht unbedingt miteinander korrelieren [162]. Deshalb war es auch möglich, dass der mRNA-Level von Cx43 bis 48 h nach der Behandlung der WB-F344 Zellen im Vergleich zur Kontrolle durchgehend verringert war, während das Cx43 bereits nach einer Stunde zurück in die Zellmembran wanderte und sich die ZZK spätestens 24 h nach dem Applizieren der Hochspannungspulse wieder auf demselben Niveau wie die Kontrolle befand.

4.3.3 Direkte Effekte von nsPEFs auf die Zell-Zell-Kommunikation

Es gibt verschiedene Effekte von nsPEFs auf Zellen, die wiederum einen Einfluss auf die ZZK haben können. Dazu gehören die Änderung des Membranpotentials, die Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration und der Zusammenbruch des Zytoskeletts [34, 100, 102].

Depolarisation der Plasmamembran - Eine Studie an Jurkat Zellen, die mit Pulsen mit einer Länge von 60 ns und Feldstärken von bis zu 100 kV/cm behandelt wurden, zeigte, dass die Depolarisation der Plasmamembran innerhalb von wenigen Nanosekunden abläuft [163]. Das Schließen der GJs findet innerhalb weniger Zehntelsekunden statt [88]. Die Ergebnisse des Fluoreszenzfarbstoff-Transfer Assays zeigten jedoch, dass die ZZK 5 min nach der Behandlung der Zellen mit nsPEFs verhältnismäßig wenig beeinflusst war. Der ausgeprägteste Effekt trat erst 15 min nach dem Applizieren der Pulse auf. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass eine Depolarisation der Zellen als Ursache für den beobachteten Effekt auf die ZZK ausgeschlossen werden kann, da die Inhibierung der ZZK ansonsten viel schneller hätte auftreten müssen. Vermutlich waren die verwendeten Pulse mit 100 ns zu kurz und die gewählte maximale Feldstärke von 20 kV/cm zu gering, um eine Depolarisation der Plasmamembran hervorzurufen, die ein Schließen der GJs bewirken würde.

Intrazelluläre Calciumkonzentration - Ein weiterer möglicher Mediator ist die Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration, die ebenfalls eine Inhibierung der ZZK nach sich ziehen kann. Versuche an Jurkat Zellen, die Hochspannungspulsen mit einer Dauer von 60 ns und Feldstärken von 25, 50 bzw. 100 kV/cm ausgesetzt wurden, ergaben einen Feldstärke-abhängigen Anstieg des intrazellulären Calcium-Levels innerhalb von wenigen Millisekunden. Dabei war der Calcium-Level in Zellen, die mit 25 kV/cm behandelt wurden, verhältnismäßig geringfügig erhöht und bereits nach 30 s wieder auf Kontroll-Niveau abgesunken [46]. Ein Schließen der GJs aufgrund einer Erhöhung des zytoplasmatischen Calciums findet innerhalb etwa einer Minute statt [164-166]. Somit ist die Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Speichern als Ursache der inhibierten ZZK aus denselben Gründen wie im Fall der Depolarisation der Plasmamembran eher unwahrscheinlich.

Zytoskelett - Für den Auf- und Abbau von GJs wird ein intaktes Zytoskelett benötigt. Am Beispiel von Linsenepithelzellen konnte gezeigt werden, dass eine Behandlung mit Aktin-depolymerisierenden Substanzen zu einer signifikanten Reduktion der ZZK und einer vermehrten Anreicherung von Cx43 im Zytoplasma führte [167]. In einer Studie an HeLa Zellen wurde der komplette Zusammenbruch des Aktin-Zytoskeletts nach dem Applizieren

von einem 60 ns-Puls mit 15 kV/cm beschrieben [34]. Wie die Immunfluoreszenzfärbung in der vorliegenden Arbeit zeigte, führte auch die Behandlung der WB-F344 Zellen mit nsPEFs zu einer Umstrukturierung des Aktin-Zytoskeletts, jedoch nicht zu einem kompletten Zusammenbruch. Die Störung des Aktins könnte zum einen dazu beigetragen haben, dass keine neuen GJ zur Plasmamembran transportiert werden konnten, zum anderen aber auch zur Aktivierung von MAP-Kinasen aufgrund von strukturellen Fluktuationen in der Zelle [168, 169]. Da das Aktin-Zytoskelett nur in Bruchstücke zerfallen und nicht komplett zusammengebrochen war, war der direkte Effekt auf die ZZZK vermutlich eher gering. Falls überhaupt, hat die Umstrukturierung des Zytoskeletts wahrscheinlich eher indirekt über die Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden zur Änderung der ZZZK beigetragen.

ZO-1 – Neben einem intakten Zytoskelett hängt die Bildung von GJ Kanälen auch von anderen Junctions, wie z.B. Tight Junctions, ab. Diese verbinden benachbarte Zellen miteinander und sorgen für einen engen Zusammenhalt. Zudem ist bekannt, dass Connexine direkt mit Tight Junction Proteinen wie ZO-1 interagieren und co-lokalisieren [96, 97]. Die Immunfluoreszenzfärbung von ZO-1 in WB-F344 Zellen nach dem Applizieren von Hochspannungspulsen zeigte keine signifikanten Veränderungen im Vergleich zu den unbehandelten Zellen (Abb. 3.15). Somit ist es eher unwahrscheinlich, dass sich die Zellen aufgrund der nsPEFs voneinander getrennt haben und die ZZZK dadurch unterbrochen wurde. Allerdings schienen die Zellränder verglichen mit den unbehandelten Zellen nach dem Applizieren der Pulse nicht mehr so klar definiert zu sein. Dies könnte ebenfalls auf strukturelle Fluktuationen der Zelle hinweisen, die eventuell zur Auslösung intrazellulärer Signalkaskaden geführt haben könnten.

4.3.4 Indirekte Effekte von nsPEFs auf die Zell-Zell-Kommunikation

Neben den direkten Effekten auf die ZZZK können nsPEF auch Signalkaskaden in Zellen auslösen, wie z.B. die Aktivierung von MAP-Kinasen. Diese können wiederum zur Hyperphosphorylierung von Connexin und zur Internalisierung von GJs führen. Der Zusammenhang zwischen der Aktivierung von MAP-Kinasen und deren Auswirkungen auf die ZZZK wurde bereits in mehreren Studien an WB-F344 Zellen gezeigt. Die Behandlung mit dem Proteinsynthese-Inhibitor Anisomycin beispielsweise aktiviert p38, das eine vermehrte Phosphorylierung von Cx43 bewirkt. Das wiederum fördert den Abbau von Cx43 und führt zu einer verminderten ZZZK [170]. Auch Wasserstoffperoxid (H_2O_2) führt zur Hyperphosphorylierung von Cx43 und hemmt die ZZZK. Als Ursache wird oxidativer Stress vermutet,

der die Aktivierung von MAP-Kinasen nach sich ziehen kann [171]. Ein Extrakt aus dem Pilz *Phellinus linteus* hingegen verhindert die Aktivierung von p38 und Erk1/2 durch H_2O_2 [172]. TPA (12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate) aktiviert in Rattenleberzellen die Proteinkinase C (PKC), die wiederum Erk aktiviert. Dies führt zur Hyperphosphorylierung von Cx43 und zur Internalisierung der GJs. Dabei ist unklar, ob Erk direkt für den durch TPA verursachten Effekt verantwortlich ist oder andere Signalkaskaden involviert sind. Eine Hyperphosphorylierung könnte eine Konformationsänderung in Cx43 bewirken, die zum Schließen der GJs und weiterhin zur Internalisierung der Connexine führen können [173]. Nach der Inkubation von WB-F344 Zellen mit Cannabinoiden konnte innerhalb von 5 min eine Aktivierung von Erk1/2 gezeigt werden, dabei wurde der Phosphorylierungsstatus von Cx43 nicht signifikant verändert. Trotzdem wurde die ZZK innerhalb von 10 min reversibel inhibiert. Cx43 ist kein direktes Substrat für Erk und die Aktivierung von Erk korreliert nicht zwingend mit einer veränderten Phosphorylierung von Cx43 [174]. Mit H-ras transformierte Rattenleberepithelzellen besitzen überwiegend nur unphosphoryliertes Cx43 und weisen keine ZZK auf. Untersuchungen zeigten, dass das Onkogen sowohl die Aktivierung von Erk1/2 als auch von p38 bewirkte, aber wahrscheinlich nur p38, nicht aber Erk1/2, für die Inhibierung der ZZK verantwortlich ist [175].

Dass nsPEFs MAP-Kinasen aktivieren können, wurde bereits an HeLa Zellen gezeigt, die mit ähnlichen Pulsparametern behandelt wurden, wie sie in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden. Dazu wurden die Zellen in Suspension gebracht und 20 Pulse mit einer Länge von 80 ns und einer Feldstärke von 20 kV/cm appliziert. Die anschließende Proteinanalyse zeigte eine Aktivierung sowohl von Erk als auch p38 innerhalb von 15 min [49]. Die Behandlung der WB-F344 Zellen mit nsPEFs in der vorliegenden Studie führte ebenfalls zu einer signifikanten Aktivierung von Erk innerhalb von 15 min (Abb. 3.17). Im Gegensatz zu den Ergebnissen der Studie an den HeLa Zellen konnte eine Aktivierung von p38 jedoch erst 6 h nach dem Applizieren der Pulse nachgewiesen werden (Abb. 3.18). Dieser Unterschied könnte darauf zurückzuführen sein, dass die durch nsPEFs ausgelösten Effekte Zelltyp-spezifisch sein könnten, sodass dieselbe Behandlung in verschiedenen Zelllinien unterschiedliche Effekte hervorrufen kann. Die Aktivierung von Erk nach 15 min steht im Einklang zur Inhibierung der ZZK, die ebenfalls 15 min nach der Behandlung am signifikantesten war.

Sowohl die Aktivierung von Erk als auch von p38 können zur Hyperphosphorylierung von Cx43 führen. Die Proteinanalyse der WB-F344 Zellen zeigte 30 min und 24 h nach dem Applizieren der Hochspannungspulse eine Hyperphosphorylierung von Cx43, während das

Phosphorylierungsmuster 6 h nach der Behandlung im Vergleich zur Kontrolle weitestgehend unverändert war (Abb. 3.19). Weiterhin können die Aktivierung von MAP-Kinasen sowie die Hyperphosphorylierung von Cx43 zum Abbau der GJs aus der Plasmamembran führen [170, 173], was mit den Ergebnissen der Immunfluoreszenzfärbung korreliert (Abb. 3.14). 30 min nachdem die Zellen den nsPEFs ausgesetzt waren, waren kaum mehr GJs in der Membran nachweisbar, was auch mit der gleichzeitig herabgesetzten ZZK übereinstimmt. Des Weiteren konnte eine Aktivierung von p38 6 h nach der nsPEF-Behandlung und eine erneute Hyperphosphorylierung von Cx43 nach 24 h nachgewiesen werden, die jedoch nicht mit einer inhibierten ZZK einherging. Die frühe Hyperphosphorylierung von Cx43 innerhalb von 30 min nach der nsPEF-Behandlung könnte durch das aktivierte Erk hervorgerufen worden sein, während die Hyperphosphorylierung nach 24 h durch p38 herbeigeführt worden sein könnte. Die Proteinanalyse zeigte, dass hauptsächlich Erk2 aktiviert wurde, jedoch kaum Erk1. Erk1 und 2 bewirken in der Zelle sehr ähnliche Effekte und teilen sich dieselben Aktivatoren und Substrate [176]. Trotzdem gibt es Anzeichen für Isoform-spezifische Funktionen [177, 178]. So konnte für Erk2 eine positive Rolle in der Kontrolle der normalen sowie der Ras-abhängigen Zellproliferation nachgewiesen werden, während Erk1 eher das Gesamtergebnis der Signalgebung der Zelle beeinflusst, indem es der Erk2 Aktivität entgegenwirkt [179]. Der funktionelle Unterschied zwischen Erk1 und 2 ist jedoch noch nicht genau geklärt. Die nsPEFs schienen in den WB-F344 Zellen vor allem Erk2 aktiviert zu haben, das dann für die frühe Phosphorylierung von Cx43 verantwortlich war.

Verschiedene Modulatoren können unterschiedliche Phosphorylierungsstellen von Cx43 phosphorylieren, was sich in unterschiedlichen Effekten auswirken kann. So muss, wie bereits in anderen Studien gezeigt, eine Änderung der Cx43-Phosphorylierung nicht zwangsläufig in einer veränderten ZZK enden [174]. Einige Chemikalien, die die ZZK herabsetzen, können zusätzlich MAP-Kinasen aktivieren, wobei die inhibierende Wirkung MAP-Kinase-unabhängig war und über die Aktivierung von Phosphatidylcholin-spezifischer Phospholipase C oder noch nicht identifizierte Mechanismen ausgelöst wurde [180-183]. Die genauen Ursachen, die nach der Behandlung der Zellen mit nsPEFs zur Inhibierung der ZZK geführt haben, müssen somit noch weiter untersucht werden, z.B. durch die Verwendung von MAP-Kinase-Inhibitoren.

4.4 Zellelastizität, Transformation und Metastasierungspotential

Die Elastizität von Zellen hängt vor allem von einem intakten Zytoskelett ab. Während der Entwicklung von Krebs ändert sich die Steifigkeit einer Zelle, sie wird weicher [121, 123, 124]. Der Hauptgrund hierfür ist die Umstrukturierung des Aktin-Zytoskeletts [118, 122]. Diese sorgt auch dafür, dass sich die Motilität der Zellen erhöht, was die Bildung von Metastasen fördert [127, 128]. Wie die Immunfluoreszenzfärbung der WB-F344 Zellen zeigte, bewirkte die Behandlung der Zellen mit nsPEFs ebenfalls eine Umstrukturierung des Aktin-Zytoskeletts (Abb. 3.14). Dabei korrelieren die Ergebnisse der Immunfluoreszenzfärbung mit den topographischen AFM-Aufnahmen (Abb. 3.22). Beide Methoden zeigen, dass die Aktinfasern innerhalb weniger Minuten nach der Behandlung ihre geordnete Struktur verloren hatten und in Bruchstücke zerfallen waren. Das Aktin-Zytoskelett hatte sich auch 30 min nach dem Applizieren der Pulse nicht erholt. Die Elastizitätsmessungen ergaben, dass die Zellen 8 min nach dem Applizieren der Hochspannungspulse um etwa ein Drittel weicher waren im Vergleich zu den unbehandelten Zellen (Abb. 3.23). Dieses Ergebnis könnte vermuten lassen, dass gepulste elektrische Felder möglicherweise krebsähnliche Charakteristika in Zellen hervorrufen und auch die Motilität von Zellen ändern könnten. Deshalb wurden ein Scratch Assay und ein Soft Agar Colony Formation Assay durchgeführt. Im Gegensatz zu Tumorzellen können normale Zellen nicht verankerungsunabhängig wachsen. Während die tumorigenen WB-ras Zellen Kolonien im Agar ausbildeten, formten weder die unbehandelten noch die behandelten WB-F344 Zellen Kolonien, gleich welche Pulsparameter verwendet wurden (Abb. 3.28). Auch der Scratch Assay zeigte keinen signifikanten Unterschied in der Proliferation und Migration der Zellen (Abb. 3.27). Die Ergebnisse implizieren, dass nsPEFs nicht zu krebsartigen Veränderungen zu führen scheinen und somit weder die Entstehung von Krebs noch die Bildung von Metastasen fördern.

Bezogen auf die verminderte Elastizität könnte es dafür mehrere Gründe geben. Der Elastizitätsmodul war zwar 8 min nach dem Applizieren der elektrischen Pulse signifikant herabgesetzt, begann sich jedoch bereits nach 13 min zu erholen. Damit war die Dauer, während der die Zellen weicher waren, relativ gering und wahrscheinlich nicht ausreichend, um eine Änderung der Motilität zu bewirken. Zudem waren die WB-F344 Zellen, auch als sie am weichsten waren, immer noch doppelt so steif wie die tumorigenen WB-ras Zellen. Weiterhin waren in den WB-F344 Zellen auch nach dem Applizieren der Hochspannungspulse noch Aktinfasern erkennbar, auch wenn diese im Vergleich zur Kontrolle nicht mehr ganz intakt gewesen zu sein schienen (Abb. 3.14 und 3.22). Im Gegensatz dazu waren in

den WB-ras Zellen kaum Aktinfasern nachweisbar (Abb. 3.25). Die Tumorzellen besitzen eine andere Zytoskelett-Struktur als gesunde Zellen, ihnen fehlen beispielsweise die Aktin-Stressfasern [118].

Das Aktin-Zytoskelett hatte auch eine Stunde nach der Behandlung der Zellen mit nsPEFs nicht wieder dieselbe Struktur wie zuvor, gleichzeitig lag die Elastizität der Zellen jedoch bereits nach 13 min fast wieder auf Kontroll-Niveau. Dabei spielen die weiteren Komponenten des Zytoskeletts (Mikrotubuli und Intermediärfilamente) wahrscheinlich eher eine untergeordnete Rolle, da sie kaum zur Zellelastizität beitragen [120, 184]. Es muss also noch weitere Faktoren geben, die die Zellelastizität beeinflussen. Möglicherweise führten strukturelle Änderungen der Plasmamembran oder eine Änderung des osmotischen Drucks in der Zelle zum Anstieg der Elastizität [185]. Auffällig ist auch, dass die Zellen 18 und 23 min nach dem Applizieren der elektrischen Pulse sogar, wenn auch nicht signifikant, steifer wurden als die unbehandelten Zellen, bevor sie sich wieder dem Kontroll-Niveau anglichen. Es wäre möglich, dass die Zelle in einer Art Regelkreis versucht, dem Elastizitätsverlust entgegenzuwirken, wodurch die Zelle erst einmal steifer wird, bevor sie sich wieder auf Kontroll-Niveau einpendelt.

Auch im Fall der zeitaufgelösten AFM-Messreihe an den unbehandelten WB-F344 Zellen war eine gewisse Änderung der Elastizitätsmoduln über die Zeit erkennbar (Abb. 3.22b). Wahrscheinlich bewirkte der Druck durch den Cantilever, ähnlich wie die nsPEF-Behandlung, einen mechanischen Stress in den Zellen, dem die Zellen versuchten entgegenzuwirken. Dieser Stress kann zwar zur Änderung der Zellelastizität beigetragen haben, diese jedoch nicht komplett erklären. So variierten die Elastizitätsmoduln der Zeitreihe der unbehandelten Zellen nur um ca. 20 kPa, während sie sich im Fall der behandelten Zellen um ungefähr 50 kPa änderten. Weiterhin wurden die Adhäsionspunkte in den Elastizitäts-Aufnahmen der unbehandelten Zellen mit der Zeit immer größer (Abb. 3.22, mittlere Spalte, blaue Pfeile), was ebenfalls eventuell auf mechanischen Stress zurückzuführen sein könnte. Normalerweise lösen sich Zellen unter Stress eher schneller vom Untergrund ab. Möglicherweise reichte die Pause zwischen den einzelnen Messungen, dass die Zellen versuchten dem entgegenzuwirken und ihre Adhäsionspunkte vergrößerten. Ansonsten waren die Zellen unverändert geblieben, weder die Zellform noch die Aktinfasern hatten sich erkennbar verändert. Im Vergleich dazu schien sich die komplette Struktur der mit nsPEFs behandelten Zellen aufgelöst zu haben (Abb. 3.22a).

Für eine tiefergehende Analyse wurden die Änderungen der Elastizitäten über dem Zellkern und dem Rand der Zelle getrennt betrachtet. Dabei ähnelte der zeitliche Verlauf der

Elastizitätsänderungen über dem Zellkern stark dem der Elastizität der gesamten Aufnahme (Abb. 3.24). Auch hier war die Zelle 8 min nach der Behandlung mit nsPEFs signifikant weicher im Vergleich zur Kontrolle und fing bereits nach 13 min an sich zu regenerieren. Zudem war die Elastizität über dem Zellkern 8 min nach dem Applizieren der Hochspannungspulse annähernd gleich wie die Elastizität über dem Zellkern der tumorigenen WB-ras Zellen. Im Vergleich zum Bereich über dem Zellkern war die Elastizität über dem Rand der Zelle zum gleichen Zeitpunkt sogar um ein Drittel geringer als die Elastizität über dem Randbereich der WB-ras Zellen und auch signifikant verringert im Vergleich zur Kontrolle. Im Gegensatz zum Bereich über dem Zellkern erholte sich die Elastizität über dem Randbereich der behandelten Zellen nicht. Da der Elastizitätsmodul bei einer Eindringtiefe des Cantilevers von 300 nm gemessen wurde und sich das Aktin auch 30 min nach der Behandlung noch nicht regeneriert hatte, könnte die Messung durch das Substrat beeinflusst worden sein, weshalb die Elastizität auch bei der Messung nach 28 min kaum einen Anstieg zeigte. Im Vergleich dazu besitzt der Zellkern selbst bereits eine gewisse Elastizität und ist in der Lage sich zu deformieren, um sich so Änderungen der Zellform anzupassen [186]. Möglicherweise kann der Effekt der Hochspannungspulse durch eine Adaption des Zellkerns schneller kompensiert werden.

Vergleicht man die Elastizitätsmoduln der normalen Zellen 8 min nach der nsPEF-Behandlung mit denen der Tumorzellen, so besaßen beide Zellen über dem Zellkern in etwa dieselbe Elastizität, während die WB-ras im Bereich über dem Zellrand sogar steifer waren. Betrachtet man die durchschnittliche Elastizität über die gesamte Zelle waren die Tumorzellen jedoch erheblich weicher als die behandelten WB-F344 Zellen. Zudem ähnelt der zeitliche Verlauf der Elastizitätsmoduln der gesamten Zelle dem Verlauf über dem Zellkern, jedoch nicht dem über dem Rand. Folglich scheint die Gesamtelastizität der Zellen hauptsächlich durch die Elastizitäten über dem Nukleus bestimmt zu werden. In zukünftigen Experimenten müssten vor allem im Randbereich die Messungen für geringere Eindringtiefen des Cantilevers (z.B. 100 nm) ausgewertet werden, um einen Einfluss des Substrats ausschließen zu können, da diese Regionen in adhärenierten Zellen weniger als 500 nm hoch sind [186].

Eine Änderung der Elastizität von Zellen nach der Behandlung mit gepulsten elektrischen Feldern wurde bereits in einigen Publikationen beschrieben. So wurde beispielsweise eine Studie an einzelnen CHO Zellen durchgeführt, die Elektroporationspulsen (5 ms und 400 V/cm) ausgesetzt wurden. Die Elastizitätsmoduln wurden für eine Eindringtiefe des Cantilevers von 50 nm bestimmt. Ähnlich wie im Fall der Nanosekunden Pulse bei den

WB-F344 Zellen, waren die Elastizitätsmoduln der CHO Zellen 8 min nach der Behandlung signifikant herabgesetzt und begannen sich nach 17 min zu erholen. Allerdings verhielt sich das Zytoskelett anders. Die Messungen an den CHO Zellen zeigten bis 15 min nach dem Applizieren der elektrischen Pulse eine Abwesenheit von Aktinfasern unter der Membranoberfläche, die nach 23 min begannen sich zu regenerieren. Im Vergleich dazu waren die Aktinfasern in den WB-F344 Zellen ebenfalls bereits nach 5 min verändert, wobei trotzdem zu jeder Zeit noch Aktinfasern nachweisbar waren, jedoch begann sich das Aktin-Zytoskelett erst nach 60 min zu erholen. Das heißt, auch im Fall der CHO Zellen korrelierte der zeitliche Verlauf der Zellelastizität nicht mit den Änderungen des Aktin-Zytoskeletts. Es wurde vermutet, dass das Weicherwerden der Zellen ein dynamischer Prozess ist und dass neben den direkten Effekten aufgrund der elektrischen Pulse noch weitere Effekte in der Zelle ausgelöst worden sein müssen, die die Elastizität beeinflussen haben [187]. Die Ergebnisse dieser Studie lassen sich jedoch nur schwer mit den Resultaten der vorliegenden Arbeit vergleichen. So wurden beispielsweise unterschiedliche Zelllinien verwendet, die unterschiedlich auf elektrische Pulse reagieren können, und unterschiedliche Pulsparameter. Im Fall der Elektroporationspulse müssen z.B. auch Änderungen des osmotischen Drucks und folglich ein Anschwellen der Zellen mit in Betracht gezogen werden. Und schließlich wurden die Elastizitätsmoduln bei unterschiedlichen Eindringtiefen des Cantilevers bestimmt, wodurch neben dem Aktin auch die Lipid-Doppelschicht der Membran einen Einfluss auf die Steifigkeit haben kann. In einer anderen Studie wurden ebenfalls CHO Zellen behandelt, jedoch mit Nanosekunden Pulsen (50 oder 100 Pulse, 10 ns, 150 kV/cm) anstatt mit Elektroporationspulsen. Die Messungen wurden an erst kurz adhierten, noch runden Zellen durchgeführt und die Elastizitätsmoduln bei einer Eindringtiefe des Cantilevers von 500 nm bestimmt. Die Ergebnisse zeigten eine Verringerung der Zellelastizität um 50 % und einen teilweisen Zusammenbruch des Aktin-Zytoskeletts [188]. Dieses Ergebnis korreliert mit den Resultaten der vorliegenden Arbeit, trotz der wesentlich kürzeren Pulse und höheren Feldstärke. In beiden Studien kam es nach dem Applizieren von Nanosekunden Pulsen zu einer Umstrukturierung des Aktin-Zytoskeletts, jedoch konnte kein kompletter Zusammenbruch nachgewiesen werden.

Die Messdaten wiesen eine relativ große Standardabweichung auf. Dies liegt vor allem daran, dass die Elastizität an Zellen in einem Monolayer gemessen wurde. Zum einen hängt die Elastizität stark von der Form der Zellen ab, also ob sie rund oder flach ausgebreitet sind [186], und somit auch von der Zelldichte. Ein weiterer Aspekt ist, dass die AFM-Aufnahmen über eine größere Fläche ($30 \times 30 \mu\text{m}^2$) und damit auch über mehrere Zellen

gemacht wurden. Je nachdem an welcher Stelle gemessen wurde, befanden sich so mehr Anteile vom Zellrand oder auch mehr Anteile vom Zellkern im Bereich der Aufnahme. Dies erklärt auch, warum bei der getrennten Betrachtung der Elastizitäten von Kern und Rand die Werte der Elastizitätsmoduln stark variierten. Insgesamt war die mittlere Standardabweichung jedoch relativ konstant.

4.5 Bedeutung für medizinische Anwendungsmöglichkeiten von nsPEFs

Seit ein paar Jahren wird die Elektrochemotherapie als ein etabliertes Verfahren in Kliniken zur palliativen Behandlung von Krebs eingesetzt [10, 189-191]. In den letzten 10 Jahren wurden auch nsPEFs als neue Therapiemöglichkeit bei Krebs untersucht, da sie gegenüber der Elektrochemotherapie den Vorteil haben, dass sie auch ohne den Einsatz von Medikamenten Apoptose induzieren können [16, 192]. Während es bei der Behandlung von Krebs primär um das Abtöten von Zellen geht, wurden in der vorliegenden Arbeit die Untersuchungen zur ZZK in einem subletalen Pulsparameter-Bereich durchgeführt. Gerade bei der Verwendung von Nadelelektroden könnte es sein, dass Zellen, die sich in einiger Entfernung zu den Elektroden befinden, einem elektrischen Feld ausgesetzt sind, dessen Feldstärke je nach Entfernung soweit abgeschwächt ist, dass die Zellen nicht mehr abgetötet und eventuell andere Effekte, wie z.B. die Inhibierung der ZZK, ausgelöst werden. Eine gestörte ZZK wird mit der Entstehung von Krebs und der Bildung von Metastasen assoziiert. Wie in zahlreichen Studien gezeigt wurde, ist ein Charakteristikum von Tumorzellen, dass sie weder untereinander noch mit ihren gesunden Nachbarzellen kommunizieren [112, 113]. Die in dieser Arbeit untersuchte Behandlung der WB-F344 führte zu einer Inhibierung der ZZK mit einer gleichzeitigen Herabregulierung der Gen- und Proteinexpression von Cx43. Während sich die ZZK und die Proteinexpression von Cx43 nach 24 h wieder komplett regeneriert hatten, war die Genexpression auch noch nach 24 h nach unten reguliert, wenn auch nicht mehr signifikant (Abb. 3.16). Aufgrund dieser Ergebnisse erscheinen nsPEFs, zumindest im Hinblick auf die ZZK, erst einmal ungeeignet zur Behandlung von Krebs. Die Untersuchung der mit nsPEFs behandelten Zellen auf maligne Transformation und ihre Migrationsgeschwindigkeit zeigten jedoch keine Änderungen im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 3.27 und 3.28). Wahrscheinlich ist die Dauer, während der die Effekte auf die ZZK und die Gen- und Proteinexpression von Cx43 anhalten, zu kurz, um die Zellen negativ zu beeinflussen. Dabei bleibt offen, ob eine wiederholte Behandlung der Zellen zu

einer dauerhaft verminderten ZZZK und dadurch eventuell zur Entstehung von Krebs führen könnte. Diese Frage müsste in weiteren Studien erforscht werden.

Weiterhin wären Untersuchungen zur ZZZK an anderen Zelllinien als den hier verwendeten interessant, da verschiedene Zelltypen unterschiedlich auf denselben Stimulus reagieren können. Zudem sollten auch die Pulsparameter, wie Pulslänge, Feldstärke, Pulsanzahl und Wiederholungsrate, variiert werden. Die Versuche an den tumorigenen WB-ras Zellen zeigten zwar eine komplette Inhibierung der ZZZK, aber möglicherweise existieren Bedingungen, die zur Wiederherstellung der ZZZK führen können und so einen Ansatz zur Therapie von Krankheiten liefern, die auf einer gestörten ZZZK beruhen.

Während eine verminderte ZZZK bei der Behandlung von Krebs eher von Nachteil ist, könnte sie im Fall der Wundheilung förderlich sein, indem sie verletzte Zellen von ihrer gesunden Umgebung isoliert, was eine essentielle Voraussetzung für die Wundheilung ist. Im Gegensatz zu akuten Wunden ist die Cx43-Expression in den Wundrändern von chronischen und diabetischen Wunden signifikant erhöht. Die Behandlung der WB-F344 Zellen mit nsPEFs wiesen eine Herabregulierung sowohl der ZZZK als auch der Gen- und Proteinexpression von Cx43 auf, wobei die Hochspannungspulse vor allem im Hinblick auf die Genexpression eine langanhaltende Wirkung zeigten. Auch hier wäre es interessant in zukünftigen Experimenten herauszufinden, ob eine Mehrfachbehandlung der Zellen die Cx43-Expression dauerhaft senken könnte. So könnte die regelmäßige Behandlung von chronischen Wunden mit nsPEFs zur Wundheilung beitragen.

5 Zusammenfassung

Zellen in einem Gewebe sind über Kanäle, sogenannte Gap Junctions (GJs), miteinander verbunden, die eine direkte Kommunikation zwischen benachbarten Zellen ermöglichen. GJs werden aus Connexinen (Cx) gebildet und erlauben den diffusiven Austausch bestimmter Moleküle, wie beispielsweise Aminosäuren oder Botenstoffen. Die Zell-Zell-Kommunikation kann durch mehrere Faktoren reguliert werden. Neben der Anzahl der GJs in der Membran ist auch ihr funktionaler Zustand entscheidend. Das Öffnen und Schließen der Kanäle wird normalerweise hauptsächlich über die Phosphorylierung der Connexine reguliert, die durch Phosphatasen und Proteinkinasen (z.B. MAP-Kinasen) phosphoryliert werden. Die ZZZ über Gap Junctions ist essentiell zur Aufrechterhaltung der Homöostase in Geweben. Eine Störung dieses Gleichgewichts kann in unterschiedlichen Krankheiten resultieren. Bei der Entstehung von Krebs ist die Kommunikation zwischen Tumorzellen und den sie umgebenden Zellen inhibiert, wodurch sich die entarteten Zellen der Kontrolle durch gesunde Zellen entziehen. Im Gegensatz dazu ist im Fall von chronischen Wunden eine Isolation der verletzten Zellen von ihrer gesunden Umgebung ein entscheidender Schritt im Heilungsprozess.

Nanosekunden gepulste elektrische Felder (nsPEFs) werden seit längerem auf ihre biomedizinischen Anwendungsmöglichkeiten untersucht, insbesondere zur Behandlung von Krebs. Neben der Induktion der Apoptose können sie vor allem intrazelluläre Effekte hervorrufen, wie z.B. die Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Speichern oder den Zusammenbruch des Aktin-Zytoskeletts. Viele dieser Effekte sind auch potentielle Modulatoren der ZZZ. Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob und wie nsPEFs die Kommunikation zwischen Zellen über GJs beeinflussen können und so eventuell die Behandlung bestimmter Krankheiten verbessert werden könnte. Die Ergebnisse zeigen, dass neben einer vorübergehenden Inhibierung der ZZZ auch die Gen- und Proteinexpression von Cx43 verändert, MAP-Kinasen aktiviert und die Zellelastizität herabgesetzt wurde.

Für die Versuche wurden Rattenleberepithelzellen (WB-F344) in Monolayern 20 Hochspannungspulsen mit einer Dauer von 100 ns und Feldstärken zwischen 10 und 20 kV/cm ausgesetzt. Knapp 90 % der Zellen überlebten diese Behandlung und es konnte keine Elektroporation für den gewählten Parameterbereich nachgewiesen werden. Die Ergebnisse

zeigten eine Zeit- und Feldstärke-abhängige Inhibierung der ZZK, mit einer kompletten Inhibierung 15 min nach der Anwendung von 20 kV/cm. 24 h nachdem die Zellen den nsPEFs ausgesetzt worden waren, hatte sich die ZZK wieder komplett erholt. Die Immunfluoreszenzfärbung zeigte eine ebenfalls Zeit- und Feldstärke-abhängige Veränderung der Verteilung von Cx43 in der Zelle. Eine halbe Stunde nach dem Applizieren der Hochspannungspulse waren fast alle GJs aus der Plasmamembran abgebaut, während gleichzeitig das intrazelluläre Fluoreszenzsignal zunahm. Nach 1 h begannen die GJs wieder in die Membran zurückzuwandern.

Die wahrscheinlichste Ursache der veränderten ZZK sowie der veränderten Cx43-Verteilung ist eine Aktivierung von MAP-Kinasen, die in der Proteinanalyse nachgewiesen werden konnte. 15 min nach dem Applizieren der elektrischen Pulse war Erk signifikant aktiviert, was mit einer Hyperphosphorylierung von Cx43 und der Internalisierung der GJs aus der Plasmamembran ins Zellinnere 30 min nach der Behandlung einherging. Im Gegensatz dazu war p38 erst nach 6 h aktiviert und könnte für die Hyperphosphorylierung von Cx43 nach 24 h verantwortlich sein. Auch die Genanalyse wies eine signifikante Herabregulierung des mRNA-Levels von Cx43 bis zu einer Stunde nach dem Applizieren der Hochspannungspulse auf, was mit einer ebenfalls signifikant verminderten Gesamtproteinmenge von Cx43 nach 30 min korrelierte. Nach 48 h war die Genexpression weiterhin vermindert, allerdings nicht mehr signifikant. Alle Effekte waren Zeit- und Feldstärke-abhängig und ihre Ausprägung nahm mit steigender Feldstärke zu.

Sowohl die Immunfluoreszenzfärbung als auch die AFM-Aufnahmen zeigten eine Umstrukturierung des Aktin-Zytoskeletts nach dem Applizieren von Pulsen mit einer Feldstärke von 20 kV/cm. Der zeitliche Verlauf der Elastizitätsmessungen wies nach, dass die Zellen direkt nach der nsPEF-Behandlung signifikant weicher wurden, sich jedoch schnell wieder regenerierten. Dabei wurde die Gesamtelastizität über den Zellen hauptsächlich durch die Elastizität über dem Zellkern bestimmt. Obwohl ein Weicherwerden von Zellen mit der Malignität assoziiert wird, konnte mittels Soft Agar Formation Assay bzw. Scratch Assay keine maligne Transformation und auch keine Änderung der Migrationsgeschwindigkeit nachgewiesen werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine Behandlung von Zellen mit nsPEFs im Hinblick auf die ZZK zwar keine weiteren Vorteile bei der Krebstherapie zu haben scheint, jedoch auch keine unerwünschten Nebenwirkungen wie eine maligne Transformation nach sich zieht. Dafür wäre eine Anwendung im Bereich der Wundheilung denkbar, bei der eine

5 Zusammenfassung

unterdrückte ZZK und die Herabregulierung von Cx43 einen entscheidenden Prozess in der Wundheilung darstellen.

6 Literaturverzeichnis

1. Nollet, J.A., *Recherches sur les causes particulieres des phénomènes électriques et sur les effets nuisibles ou avantageux qu'on peut en attendre*. 1753: les frères Guérin.
2. Frankenhaeuser, B. and L. Widén, *Anode break excitation in desheathed frog nerve*. The Journal of physiology, 1956. **131**(1): p. 243-247.
3. Stämpfli, R., *Reversible electrical breakdown of the excitable membrane of a Ranvier node*. Ann. Acad. Brasil. Ciens, 1958. **30**: p. 57-63.
4. Neumann, E. and K. Rosenheck, *Permeability changes induced by electric impulses in vesicular membranes*. The Journal of membrane biology, 1972. **10**(1): p. 279-290.
5. Neumann, E., et al., *Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields*. The EMBO journal, 1982. **1**(7): p. 841.
6. Kolb, J.F. and M. Stacey, *Subcellular biological effects of nanosecond pulsed electric fields*, in *Plasma for Bio-Decontamination, Medicine and Food Security*. 2012, Springer. p. 361-379.
7. Heller, L.C., K. Ugen, and R. Heller, *Electroporation for targeted gene transfer*. Expert opinion on drug delivery, 2005. **2**(2): p. 255-268.
8. Kanduser, M., D. Miklavcic, and M. Pavlin, *Mechanisms involved in gene electrotransfer using high- and low-voltage pulses--an in vitro study*. Bioelectrochemistry, 2009. **74**(2): p. 265-271.
9. Mali, B., et al., *Antitumor effectiveness of electrochemotherapy: a systematic review and meta-analysis*. European Journal of Surgical Oncology (EJSO), 2013. **39**(1): p. 4-16.
10. Gothelf, A., L.M. Mir, and J. Gehl, *Electrochemotherapy: results of cancer treatment using enhanced delivery of bleomycin by electroporation*. Cancer treatment reviews, 2003. **29**(5): p. 371-387.
11. Jaroszeski, M.J., R. Gilbert, and R. Heller, *Electrochemotherapy: an emerging drug delivery method for the treatment of cancer*. Advanced drug delivery reviews, 1997. **26**(2): p. 185-197.
12. Castro, A.J., G.V. Barbosa-Cánovas, and B.G. Swanson, *Microbial inactivation of foods by pulsed electric fields*. Journal of Food Processing and Preservation, 1993. **17**(1): p. 47-73.
13. Wan, J., et al., *Advances in innovative processing technologies for microbial inactivation and enhancement of food safety--pulsed electric field and low-temperature plasma*. Trends in Food Science & Technology, 2009. **20**(9): p. 414-424.
14. Gusbeth, C., et al., *Pulsed electric field treatment for bacteria reduction and its impact on hospital wastewater*. Chemosphere, 2009. **75**(2): p. 228-233.
15. Amr, A.-G. and K.H. Schoenbach, *Biofouling prevention with pulsed electric fields*. Plasma Science, IEEE Transactions on, 2000. **28**(1): p. 115-121.
16. Schoenbach, K.H., S.J. Beebe, and E.S. Buescher, *Intracellular effect of ultrashort electrical pulses*. Bioelectromagnetics, 2001. **22**(6): p. 440-448.
17. Schoenbach, K.H., et al., *Ultrashort electrical pulses open a new gateway into biological cells*. Proceedings of the IEEE, 2004. **92**(7): p. 1122-1137.

6 Literaturverzeichnis

18. Alberts, B., et al., *Lehrbuch der Molekularen Zellbiologie*. Vol. 4., vollständig überarbeitete Auflage. 2012: Wiley-VCH, Weinheim.
19. Tsong, T.Y., *Voltage modulation of membrane permeability and energy utilization in cells*. Bioscience reports, 1983. **3**(6): p. 487-505.
20. Zimmermann, U., *Electric field-mediated fusion and related electrical phenomena*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Biomembranes, 1982. **694**(3): p. 227-277.
21. Weaver, J.C., *Electroporation: a general phenomenon for manipulating cells and tissues*. Journal of cellular biochemistry, 1993. **51**(4): p. 426-435.
22. Teissie, J., M. Golzio, and M. Rols, *Mechanisms of cell membrane electropermeabilization: a minireview of our present (lack of?) knowledge*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects, 2005. **1724**(3): p. 270-280.
23. Cole, K., *Electric impedance of marine egg membranes*. Trans. Faraday Soc., 1937. **33**: p. 966-972.
24. Schwan, H.P., *Electric characteristics of tissues*. Radiation and Environmental Biophysics, 1963. **1**(3): p. 198-208.
25. Gowrishankar, T.R., et al., *Microdosimetry for conventional and supra-electroporation in cells with organelles*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2006. **341**(4): p. 1266-1276.
26. DeBruin, K.A. and W. Krassowska, *Modeling electroporation in a single cell. I. Effects of field strength and rest potential*. Biophysical Journal, 1999. **77**(3): p. 1213-1224.
27. Gowrishankar, T. and J.C. Weaver, *Electrical behavior and pore accumulation in a multicellular model for conventional and supra-electroporation*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2006. **349**(2): p. 643-653.
28. Chang, D. and T.S. Reese, *Changes in membrane structure induced by electroporation as revealed by rapid-freezing electron microscopy*. Biophysical Journal, 1990. **58**(1): p. 1.
29. Esser, A.T., et al., *Towards solid tumor treatment by nanosecond pulsed electric fields*. Technology in cancer research & treatment, 2009. **8**(4): p. 289-306.
30. Vasilkoski, Z., et al., *Membrane electroporation: the absolute rate equation and nanosecond time scale pore creation*. Physical review E, 2006. **74**(2): p. 021904.
31. Esser, A.T., et al., *Mechanisms for the Intracellular Manipulation of Organelles by Conventional Electroporation*. Biophysical Journal, 2010. **98**(11): p. 2506-2514.
32. Beebe, S.J., et al., *Nanosecond, high-intensity pulsed electric fields induce apoptosis in human cells*. Faseb Journal, 2003. **17**(9): p. 1493-+.
33. Schoenbach, K.H., et al., *Bioelectric effects of intense nanosecond pulses*. Dielectrics and Electrical Insulation, IEEE Transactions on, 2007. **14**(5): p. 1088-1109.
34. Stacey, M., et al., *Nanosecond pulsed electric field induced cytoskeleton, nuclear membrane and telomere damage adversely impact cell survival*. Bioelectrochemistry, 2011. **82**(2): p. 131-134.
35. Chen, N., et al., *Nanosecond electric pulses penetrate the nucleus and enhance speckle formation*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2007. **364**(2): p. 220-225.
36. Hall, E.H., K.H. Schoenbach, and S.J. Beebe, *Nanosecond pulsed electric fields (nsPEF) induce direct electric field effects and biological effects on human colon carcinoma cells*. DNA and cell biology, 2005. **24**(5): p. 283-291.

37. Stacey, M., et al., *Differential effects in cells exposed to ultra-short, high intensity electric fields: cell survival, DNA damage, and cell cycle analysis*. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 2003. **542**(1): p. 65-75.
38. Beebe, S.J., K.H. Schoenbach, and R. Heller, *Bioelectric applications for treatment of melanoma*. Cancers, 2010. **2**(3): p. 1731-1770.
39. Chen, X.H., et al., *Comparative Study of Long- and Short-pulsed Electric Fields for Treating Melanoma in an In Vivo Mouse Model*. In Vivo, 2011. **25**(1): p. 23-27.
40. Chen, X.H., et al., *Apoptosis initiation and angiogenesis inhibition: melanoma targets for nanosecond pulsed electric fields*. Pigment Cell & Melanoma Research, 2010. **23**(4): p. 554-563.
41. Nuccitelli, R., et al., *Optimized nanosecond pulsed electric field therapy can cause murine malignant melanomas to self-destruct with a single treatment*. International Journal of Cancer, 2010. **127**(7): p. 1727-1736.
42. Meulenbergh, C.J.W., V. Todorovic, and M. Cemazar, *Differential Cellular Effects of Electroporation and Electrochemotherapy in Monolayers of Human Microvascular Endothelial Cells*. Plos One, 2012. **7**(12).
43. Beebe, S.J., et al. *Nanosecond pulsed electric field ablation of hepatocellular carcinoma*. in *Engineering in Medicine and Biology Society, EMBC, 2011 Annual International Conference of the IEEE*. 2011. IEEE.
44. Buescher, E.S., R.R. Smith, and K.H. Schoenbach, *Submicrosecond intense pulsed electric field effects on intracellular free calcium: mechanisms and effects*. Plasma Science, IEEE Transactions on, 2004. **32**(4): p. 1563-1572.
45. Craviso, G.L., et al., *Modulation of intracellular Ca²⁺ levels in chromaffin cells by nanoelectropulses*. Bioelectrochemistry, 2012. **87**: p. 244-252.
46. Scarlett, S.S., et al., *Regulation of intracellular calcium concentration by nanosecond pulsed electric fields*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes, 2009. **1788**(5): p. 1168-1175.
47. White, J.A., et al., *Stimulation of capacitative calcium entry in HL-60 cells by nanosecond pulsed electric fields*. Journal of Biological Chemistry, 2004. **279**(22): p. 22964-22972.
48. Zhang, J., et al., *Nanosecond pulse electric field (nanopulse): A novel non-ligand agonist for platelet activation*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2008. **471**(2): p. 240-248.
49. Morotomi-Yano, K., H. Akiyama, and K. Yano, *Nanosecond pulsed electric fields activate MAPK pathways in human cells*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2011. **515**(1-2): p. 99-106.
50. Krysko, D.V., et al., *Gap junctional communication and connexin43 expression in relation to apoptotic cell death and survival of granulosa cells*. Journal of Histochemistry & Cytochemistry, 2004. **52**(9): p. 1199-1207.
51. Sai, K., et al., *Inhibition of apoptosis by pentachlorophenol in v-myc-transfected rat liver epithelial cells: relation to down-regulation of gap junctional intercellular communication*. Cancer letters, 2001. **173**(2): p. 163-174.
52. Gaippl, U.S., et al., *Clearance deficiency and systemic lupus erythematosus (SLE)*. Journal of autoimmunity, 2007. **28**(2): p. 114-121.
53. Lauber, K., et al., *Clearance of apoptotic cells: getting rid of the corpses*. Molecular cell, 2004. **14**(3): p. 277-287.

6 Literaturverzeichnis

54. Muñoz, L.E., et al., *Scent of dying cells: the role of attraction signals in the clearance of apoptotic cells and its immunological consequences*. Autoimmunity reviews, 2010. **9**(6): p. 425-430.
55. Carneiro, J. and L. Junqueira, *Histologie*, 1996, Berlin Heidelberg New York: Springer.
56. Caspar, D., et al., *Gap junction structure*, in *Gap Junctions*. 1988, Alan R. Liss, Incorporated New York. p. 117-133.
57. Loewenstein, W.R., *Junctional intercellular communication: the cell-to-cell membrane channel*. Physiological Reviews, 1981. **61**(4): p. 829-913.
58. Makowski, L., et al., *Gap junction structures: Analysis of the x-ray diffraction data*. The Journal of Cell Biology, 1977. **74**(2): p. 629-645.
59. Unwin, P. and G. Zampighi, *Structure of the junction between communicating cells*. Nature, 1980. **283**(5747): p. 545-549.
60. Goodenough, D.A., J.A. Goliger, and D.L. Paul, *Connexins, connexons, and intercellular communication*. Annual review of biochemistry, 1996. **65**(1): p. 475-502.
61. Kumar, N.M. and N.B. Gilula, *The gap junction communication channel*. Cell, 1996. **84**(3): p. 381-388.
62. Goldberg, G.S., P.D. Lampe, and B.J. Nicholson, *Selective transfer of endogenous metabolites through gap junctions composed of different connexins*. Nature Cell Biology, 1999. **1**(7): p. 457-459.
63. Goldberg, G.S., V. Valiunas, and P.R. Brink, *Selective permeability of gap junction channels*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes, 2004. **1662**(1): p. 96-101.
64. Moreno, A., G. Fishman, and D. Spray, *Phosphorylation shifts unitary conductance and modifies voltage dependent kinetics of human connexin43 gap junction channels*. Biophysical Journal, 1992. **62**(1): p. 51.
65. Moreno, A., et al., *Gap junction channels: distinct voltage-sensitive and-insensitive conductance states*. Biophysical Journal, 1994. **67**(1): p. 113.
66. Moreno, A., et al., *Human connexin43 gap junction channels. Regulation of unitary conductances by phosphorylation*. Circulation Research, 1994. **74**(6): p. 1050-1057.
67. Takens-Kwak, B. and H. Jongsma, *Cardiac gap junctions: three distinct single channel conductances and their modulation by phosphorylating treatments*. Pflügers Archiv, 1992. **422**(2): p. 198-200.
68. Elfgang, C., et al., *Specific permeability and selective formation of gap junction channels in connexin-transfected HeLa cells*. The Journal of Cell Biology, 1995. **129**(3): p. 805-817.
69. Veenstra, R.D., *Size and selectivity of gap junction channels formed from different connexins*. Journal of bioenergetics and biomembranes, 1996. **28**(4): p. 327-337.
70. Qu, Y. and G. Dahl, *Function of the voltage gate of gap junction channels: selective exclusion of molecules*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2002. **99**(2): p. 697-702.
71. Finbow, M.E. and J.D. Pitts, *Permeability of junctions between animal cells: Intercellular exchange of various metabolites and a vitamin-derived cofactor*. Experimental cell research, 1981. **131**(1): p. 1-13.
72. Pitts, J. and J. Simms, *Permeability of junctions between animal cells: Intercellular transfer of nucleotides but not of macromolecules*. Experimental cell research, 1977. **104**(1): p. 153-163.

73. Alexander, D.B. and G.S. Goldberg, *Transfer of biologically important molecules between cells through gap junction channels*. Current medicinal chemistry, 2003. **10**(19): p. 2045-2058.
74. Dahl, E., et al., *Expression of gap junction genes, connexin40 and connexin43, during fetal mouse development*. Anatomy and embryology, 1995. **191**(3): p. 267-278.
75. Davies, T.C., et al., *Multiple members of the connexin gene family participate in preimplantation development of the mouse*. Developmental genetics, 1996. **18**(3): p. 234-243.
76. Bevilacqua, A., R. Loch-Caruso, and R.P. Erickson, *Abnormal development and dye coupling produced by antisense RNA to gap junction protein in mouse preimplantation embryos*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1989. **86**(14): p. 5444-5448.
77. Paul, D., et al., *Expression of a dominant negative inhibitor of intercellular communication in the early Xenopus embryo causes delamination and extrusion of cells*. Development, 1995. **121**(2): p. 371-381.
78. Bagnall, K., E. Sanders, and R. Berdan, *Communication compartments in the axial mesoderm of the chick embryo*. Anatomy and embryology, 1992. **186**(2): p. 195-204.
79. Goodenough, D.A. *The crystalline lens. A system networked by gap junctional intercellular communication*. in *Seminars in cell biology*. 1992. Elsevier.
80. Snipes, G.J. and U. Suter, *Molecular anatomy and genetics of myelin proteins in the peripheral nervous system*. Journal of anatomy, 1995. **186**(Pt 3): p. 483.
81. Gros, D.B. and H.J. Jongsma, *Connexins in mammalian heart function*. Bioessays, 1996. **18**(9): p. 719-730.
82. Chow, L. and S.J. Lye, *Expression of the gap junction protein connexin-43 is increased in the human myometrium toward term and with the onset of labor*. American journal of obstetrics and gynecology, 1994. **170**(3): p. 788-795.
83. Winterhager, E., et al., *Expression of different connexin genes in rat uterus during decidualization and at term*. European journal of cell biology, 1991. **55**(1): p. 133-142.
84. Daniel, E.E. and Y.F. Wang, *Gap junctions in intestinal smooth muscle and interstitial cells of Cajal*. Microscopy research and technique, 1999. **47**(5): p. 309-320.
85. Sáez, J.C., et al., *Plasma membrane channels formed by connexins: their regulation and functions*. Physiological Reviews, 2003. **83**(4): p. 1359-1400.
86. Beardslee, M.A., et al., *Rapid turnover of connexin43 in the adult rat heart*. Circulation Research, 1998. **83**(6): p. 629-635.
87. Laird, D.W., K.L. Puranam, and J.-P. Revel, *Turnover and phosphorylation dynamics of connexin43 gap junction protein in cultured cardiac myocytes*. Biochem. J, 1991. **273**: p. 67-72.
88. Lampe, P.D. and A.F. Lau, *The effects of connexin phosphorylation on gap junctional communication*. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2004. **36**(7): p. 1171-1186.
89. Lampe, P.D. and A.F. Lau, *Regulation of gap junctions by phosphorylation of connexins*. Archives of biochemistry and biophysics, 2000. **384**(2): p. 205-215.
90. Moreno, A.P., *Connexin phosphorylation as a regulatory event linked to channel gating*. Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes, 2005. **1711**(2): p. 164-171.

6 Literaturverzeichnis

91. Laird, D.W., *Connexin phosphorylation as a regulatory event linked to gap junction internalization and degradation*. Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes, 2005. **1711**(2): p. 172-182.
92. Solan, J.L. and P.D. Lampe, *Connexin phosphorylation as a regulatory event linked to gap junction channel assembly*. Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes, 2005. **1711**(2): p. 154-163.
93. Thomas, T., K. Jordan, and D.W. Laird, *Role of cytoskeletal elements in the recruitment of Cx43-GFP and Cx26-YFP into gap junctions*. Cell communication and adhesion, 2001. **8**(4-6): p. 231-236.
94. Butkevich, E., et al., *Drebrin is a novel connexin-43 binding partner that links gap junctions to the submembrane cytoskeleton*. Current biology, 2004. **14**(8): p. 650-658.
95. Barker, R.J., R.L. Price, and R.G. Gourdie, *Increased association of ZO-1 with connexin43 during remodeling of cardiac gap junctions*. Circulation Research, 2002. **90**(3): p. 317-324.
96. Giepmans, B.N., I. Verlaan, and W.H. Moolenaar, *Connexin-43 interactions with ZO-1 and α - and β -tubulin*. Cell communication and adhesion, 2001. **8**(4-6): p. 219-223.
97. Toyofuku, T., et al., *Direct association of the gap junction protein connexin-43 with ZO-1 in cardiac myocytes*. Journal of Biological Chemistry, 1998. **273**(21): p. 12725-12731.
98. Giepmans, B.N., *Gap junctions and connexin-interacting proteins*. Cardiovascular Research, 2004. **62**(2): p. 233-245.
99. Stein, L.S., J. Boonstra, and R.C. Burghardt, *Reduced cell-cell communication between mitotic and nonmitotic coupled cells*. Experimental cell research, 1992. **198**(1): p. 1-7.
100. Peracchia, C., *Chemical gating of gap junction channels: Roles of calcium, pH and calmodulin*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes, 2004. **1662**(1): p. 61-80.
101. Schuster, T., *Kommunikation Zwischen Zellen: Gap Junctions, Nexus, Elektrische Synapsen*. 1990: Akad.-Verlag.
102. Bukauskas, F.F. and V.K. Verselis, *Gap junction channel gating*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes, 2004. **1662**(1): p. 42-60.
103. Matesic, D.F., et al., *Changes in gap-junction permeability, phosphorylation, and number mediated by phorbol ester and non-phorbol-ester tumor promoters in rat liver epithelial cells*. Molecular carcinogenesis, 1994. **10**(4): p. 226-236.
104. Bergoffen, J., et al., *Connexin mutations in X-linked Charcot-Marie-Tooth disease*. Science, 1993. **262**(5142): p. 2039-2042.
105. Gerido, D.A. and T.W. White, *Connexin disorders of the ear, skin, and lens*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes, 2004. **1662**(1): p. 159-170.
106. Kelsell, D.P., W.-L. Di, and M.J. Houseman, *Connexin mutations in skin disease and hearing loss*. The American Journal of Human Genetics, 2001. **68**(3): p. 559-568.
107. Kelsell, D.P., J. Dunlop, and M.B. Hodgins, *Human diseases: clues to cracking the connexin code?* Trends in cell biology, 2001. **11**(1): p. 2-6.
108. Gerido, D.A., et al., *Aberrant hemichannel properties of Cx26 mutations causing skin disease and deafness*. American Journal of Physiology-Cell Physiology, 2007. **293**(1): p. C337-C345.
109. King, T.J. and J.S. Bertram, *Connexins as targets for cancer chemoprevention and chemotherapy*. Biochim Biophys Acta, 2005. **1719**(1-2): p. 146-60.

110. Trosko, J. and R. Ruch, *Gap junctions as targets for cancer chemoprevention and chemotherapy*. Current drug targets, 2002. **3**(6): p. 465-482.
111. Trosko, J.E. and C.-C. Chang, *Mechanism of up-regulated gap junctional intercellular communication during chemoprevention and chemotherapy of cancer*. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 2001. **480**: p. 219-229.
112. Trosko, J.E. and R.J. Ruch, *Cell-cell communication in carcinogenesis*. Front Biosci, 1998. **3**(3): p. d208-236.
113. Yamasaki, H., *Aberrant expression and function of gap junctions during carcinogenesis*. Environmental health perspectives, 1991. **93**: p. 191.
114. Brandner, J.M., et al., *Connexins 26, 30, and 43: Differences among spontaneous, chronic, and accelerated human wound healing*. Journal of Investigative Dermatology, 2004. **122**(5): p. 1310-1320.
115. Mendoza-Naranjo, A., et al., *Overexpression of the gap junction protein Cx43 as found in diabetic foot ulcers can retard fibroblast migration*. Cell Biology International, 2012. **36**(7): p. 661-667.
116. Pollok, S., et al., *Connexin 43 mimetic peptide Gap27 reveals potential differences in the role of Cx43 in wound repair between diabetic and non-diabetic cells*. Journal of Cellular and Molecular Medicine, 2011. **15**(4): p. 861-873.
117. Chanson, M., et al., *Gap junctional communication in tissue inflammation and repair*. Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes, 2005. **1711**(2): p. 197-207.
118. Ben-Ze'ev, A., *The cytoskeleton in cancer cells*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer, 1985. **780**(3): p. 197-212.
119. Sackmann, E., *Überblick-Mikromechanik der Zelle*. Physik Journal, 2004. **3**(2): p. 35-42.
120. Buehler, M.J., *Mechanical players—the role of intermediate filaments in cell mechanics and organization*. Biophysical Journal, 2013. **105**(8): p. 1733-1734.
121. Lekka, M., et al., *Elasticity of normal and cancerous human bladder cells studied by scanning force microscopy*. European Biophysics Journal with Biophysics Letters, 1999. **28**(4): p. 312-316.
122. Rao, K.M.K. and H.J. Cohen, *Actin cytoskeletal network in aging and cancer*. Mutation Research/DNAging, 1991. **256**(2): p. 139-148.
123. Rother, J., et al., *Atomic force microscopy-based microrheology reveals significant differences in the viscoelastic response between malign and benign cell lines*. Open biology, 2014. **4**(5): p. 140046.
124. Jonas, O., C.T. Mierke, and J.A. Kas, *Invasive cancer cell lines exhibit biomechanical properties that are distinct from their noninvasive counterparts*. Soft Matter, 2011. **7**(24): p. 11488-11495.
125. Cross, S.E., et al., *Nanomechanical analysis of cells from cancer patients*. Nature nanotechnology, 2007. **2**(12): p. 780-783.
126. Cross, S.E., et al., *AFM-based analysis of human metastatic cancer cells*. Nanotechnology, 2008. **19**(38).
127. Yamazaki, D., S. Kurisu, and T. Takenawa, *Regulation of cancer cell motility through actin reorganization*. Cancer science, 2005. **96**(7): p. 379-386.
128. Olson, M.F. and E. Sahai, *The actin cytoskeleton in cancer cell motility*. Clinical & experimental metastasis, 2009. **26**(4): p. 273-287.

6 Literaturverzeichnis

129. Swaminathan, V., et al., *Mechanical Stiffness Grades Metastatic Potential in Patient Tumor Cells and in Cancer Cell Lines*. Cancer research, 2011. **71**(15): p. 5075-5080.
130. Tsao, M.-S., et al., *A diploid epithelial cell line from normal adult rat liver with phenotypic properties of 'oval' cells*. Experimental cell research, 1984. **154**(1): p. 38-52.
131. de Feijter, A.W., et al., *Localization and function of the connexin 43 gap-junction protein in normal and various oncogene-expressing rat liver epithelial cells*. Molecular carcinogenesis, 1996. **16**(4): p. 203-212.
132. De Feijter, A.W., et al., *Infection of rat liver epithelial cells with v-Ha-ras: Correlation between oncogene expression, gap junctional communication, and tumorigenicity*. Molecular carcinogenesis, 1990. **3**(2): p. 54-67.
133. DeoCampo, N.D., M.R. Wilson, and J.E. Trosko, *Cooperation of bcl-2 and myc in the neoplastic transformation of normal rat liver epithelial cells is related to the down-regulation of gap junction-mediated intercellular communication*. Carcinogenesis, 2000. **21**(8): p. 1501-1506.
134. Hayashi, T., et al., *Cooperative effects of v-myc and c-Ha-ras oncogenes on gap junctional intercellular communication and tumorigenicity in rat liver epithelial cells*. Cancer letters, 1998. **128**(2): p. 145-154.
135. Kao, C.-Y., et al., *Growth requirements and neoplastic transformation of two types of normal human breast epithelial cells derived from reduction mammoplasty*. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal, 1997. **33**(4): p. 282-288.
136. Kolb, J.F., S. Kono, and K.H. Schoenbach, *Nanosecond pulsed electric field generators for the study of subcellular effects*. Bioelectromagnetics, 2006. **27**(3): p. 172-87.
137. Nuccitelli, R., et al., *Nanoelectroablation therapy for murine basal cell carcinoma*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2012. **424**(3): p. 446-450.
138. Nuccitelli, R., et al., *Nanosecond pulsed electric field stimulation of reactive oxygen species in human pancreatic cancer cells is Ca²⁺-dependent*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2013. **435**(4): p. 580-585.
139. El-Fouly, M.H., J.E. Trosko, and C.-C. Chang, *Scrape-loading and dye transfer: a rapid and simple technique to study gap junctional intercellular communication*. Experimental cell research, 1987. **168**(2): p. 422-430.
140. Binnig, G., C.F. Quate, and C. Gerber, *Atomic force microscope*. Physical review letters, 1986. **56**(9): p. 930.
141. Putman, C., et al., *Viscoelasticity of living cells allows high resolution imaging by tapping mode atomic force microscopy*. Biophysical Journal, 1994. **67**(4): p. 1749.
142. Emad, A., et al., *Relative microelastic mapping of living cells by atomic force microscopy*. Biophysical Journal, 1998. **74**(3): p. 1564-1578.
143. Weisenhorn, A.L., et al., *Deformation and height anomaly of soft surfaces studied with an AFM*. Nanotechnology, 1993. **4**(2): p. 106.
144. Butt, H.-J. and M. Jaschke, *Calculation of thermal noise in atomic force microscopy*. Nanotechnology, 1995. **6**(1): p. 1.
145. Hertz, H., *Über die Berührung fester elastischer Körper*. 1882.
146. Sneddon, I.N., *The relation between load and penetration in the axisymmetric Boussinesq problem for a punch of arbitrary profile*. International Journal of Engineering Science, 1965. **3**(1): p. 47-57.

147. Neumann, T., *Determining the elastic modulus of biological samples using atomic force microscopy*. JPK Instruments Application Report, 2008: p. 1-9.
148. Liang, C.-C., A.Y. Park, and J.-L. Guan, *In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro*. Nature Protocols, 2007. **2**(2): p. 329-333.
149. Franken, N.A., et al., *Clonogenic assay of cells in vitro*. Nature Protocols, 2006. **1**(5): p. 2315-2319.
150. Smith, G.J., W.N. Bell, and J.W. Grisham, *Clonal analysis of the expression of multiple transformation phenotypes and tumorigenicity by morphologically transformed 10T1/2 cells*. Cancer research, 1993. **53**(3): p. 500-508.
151. Pakhomov, A.G., D. Miklavcic, and M.S. Markov, *Advanced electroporation techniques in biology and medicine*. 2010: CRC Press.
152. Baldwin, W.H., et al., *Membrane permeability and cell survival after nanosecond pulsed-electric-field exposure—Significance of exposure-media composition*. Plasma Science, IEEE Transactions on, 2010. **38**(10): p. 2948-2953.
153. Schanne, F., et al., *Calcium dependence of toxic cell death: a final common pathway*. Science, 1979. **206**(4419): p. 700-702.
154. Starke, P., J. Hoek, and J. Farber, *Calcium-dependent and calcium-independent mechanisms of irreversible cell injury in cultured hepatocytes*. Journal of Biological Chemistry, 1986. **261**(7): p. 3006-3012.
155. Yang, W., et al., *Differential sensitivities of malignant and normal skin cells to nanosecond pulsed electric fields*. Technology in cancer research & treatment, 2011. **10**(3): p. 281-286.
156. Breton, M. and L.M. Mir, *Microsecond and nanosecond electric pulses in cancer treatments*. Bioelectromagnetics, 2012. **33**(2): p. 106-123.
157. Pucihar, G., et al., *The Pulse Intensity-duration dependency for Cell Membrane Electroporation*. 2010.
158. Yamaguchi, D.T., et al., *Inhibition of gap junction intercellular communication by extremely low-frequency electromagnetic fields in osteoblast-like models is dependent on cell differentiation*. Journal of Cellular Physiology, 2002. **190**(2): p. 180-188.
159. XiaoJing, D., et al., *Effect of energy controllable steep pulse on gap junction of breast cancer cells*. Tumor, 2009. **29**(4): p. 310-314.
160. Schoenbach, K.H., et al., *A scaling law for membrane permeabilization with nanopulses*. Dielectrics and Electrical Insulation, IEEE Transactions on, 2009. **16**(5): p. 1224-1235.
161. Plattner, H. and J. Hentschel, *Zellbiologie*. 2011: Georg Thieme Verlag.
162. Maier, T., M. Güell, and L. Serrano, *Correlation of mRNA and protein in complex biological samples*. FEBS letters, 2009. **583**(24): p. 3966-3973.
163. Frey, W., et al., *Plasma membrane voltage changes during nanosecond pulsed electric field exposure*. Biophys J, 2006. **90**(10): p. 3608-15.
164. Spray, D.C., et al., *Gating Of Gap Junction Channels*. Biophysical Journal, 1984. **45**(1): p. 219-230.
165. Noma, A. and N. Tsuboi, *Dependence of junctional conductance on proton, calcium and magnesium ions in cardiac paired cells of guinea-pig*. The Journal of physiology, 1987. **382**(1): p. 193-211.

6 Literaturverzeichnis

166. Rose, B. and W.R. Loewenstein, *Permeability of a cell junction and the local cytoplasmic free ionized calcium concentration: a study with aequorin*. The Journal of membrane biology, 1976. **28**(1): p. 87-119.
167. Giessmann, D., et al., *Microinjection of actin antibodies impaired gap junctional intercellular communication in lens epithelial cells in vitro*. Current eye research, 2003. **27**(3): p. 157-164.
168. Nagy, E., et al., *Hyperfluidization-coupled membrane microdomain reorganization is linked to activation of the heat shock response in a murine melanoma cell line*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2007. **104**(19): p. 7945-7950.
169. Jean-Louis, S., et al., *Deoxycholic acid induces intracellular signaling through membrane perturbations*. Journal of Biological Chemistry, 2006. **281**(21): p. 14948-14960.
170. Ogawa, T., et al., *Anisomycin downregulates gap-junctional intercellular communication via the p38 MAP-kinase pathway*. Journal of cell science, 2004. **117**(10): p. 2087-2096.
171. Upham, B.L., et al., *Hydrogen peroxide inhibits gap junctional intercellular communication in glutathione sufficient but not glutathione deficient cells*. Carcinogenesis, 1997. **18**(1): p. 37-42.
172. Cho, J.-H., et al., *The roles of ERK1/2 and p38 MAP kinases in the preventive mechanisms of mushroom Phellinus linteus against the inhibition of gap junctional intercellular communication by hydrogen peroxide*. Carcinogenesis, 2002. **23**(7): p. 1163-1169.
173. Ruch, R.J., J.E. Trosko, and B.V. Madhukar, *Inhibition of connexin43 gap junctional intercellular communication by TPA requires ERK activation*. Journal of cellular biochemistry, 2001. **83**(1): p. 163-169.
174. Upham, B.L., et al., *Cannabinoids inhibit gap junctional intercellular communication and activate ERK in a rat liver epithelial cell line*. International journal of cancer, 2003. **104**(1): p. 12-18.
175. LEE, K.W., et al., *p38 Is a Key Signaling Molecule for H-ras-Induced Inhibition of Gap Junction Intercellular Communication in Rat Liver Epithelial Cells*. Annals of the New York Academy of Sciences, 2004. **1030**(1): p. 258-263.
176. Lefloch, R., J. Pouyssegur, and P. Lenormand, *Total ERK1/2 activity regulates cell proliferation*. Cell Cycle, 2009. **8**(5): p. 705-711.
177. Harrington, H.A., et al., *Dependence of MAPK mediated signaling on Erk isoforms and differences in nuclear shuttling*. arXiv preprint arXiv:1110.3742, 2011.
178. Krens, S.G., et al., *Distinct functions for ERK1 and ERK2 in cell migration processes during zebrafish gastrulation*. Developmental biology, 2008. **319**(2): p. 370-383.
179. Vantaggiato, C., et al., *ERK1 and ERK2 mitogen-activated protein kinases affect Ras-dependent cell signaling differentially*. Journal of biology, 2006. **5**(5): p. 14.
180. Machala, M., et al., *Inhibition of gap junctional intercellular communication by noncoplanar polychlorinated biphenyls: inhibitory potencies and screening for potential mode (s) of action*. Toxicological sciences, 2003. **76**(1): p. 102-111.
181. Sovadinova, I., et al., *Phosphatidylcholine specific PLC-induced dysregulation of gap junctions, a robust cellular response to environmental toxicants, and prevention by resveratrol in a rat liver cell model*. Plos One, 2015. **10**(5).
182. Upham, B.L., et al., *Tumor promoting properties of a cigarette smoke prevalent polycyclic aromatic hydrocarbon as indicated by the inhibition of gap junctional intercellular communication via phosphatidylcholine-specific phospholipase C*. Cancer science, 2008. **99**(4): p. 696-705.

183. Upham, B.L., et al., *Inhibition of gap junctional intercellular communication and activation of mitogen-activated protein kinase by tumor-promoting organic peroxides and protection by resveratrol*. Nutrition and cancer, 2007. **57**(1): p. 38-47.
184. Haga, H., et al., *Elasticity mapping of living fibroblasts by AFM and immunofluorescence observation of the cytoskeleton*. Ultramicroscopy, 2000. **82**(1): p. 253-258.
185. Chopinet, L., E. Dague, and M.P. Rols, *AFM Sensing Cortical Actin Cytoskeleton Destabilization During Plasma Membrane Electroporation*. Cytoskeleton, 2014. **71**(10): p. 587-594.
186. Caille, N., et al., *Contribution of the nucleus to the mechanical properties of endothelial cells*. Journal of biomechanics, 2002. **35**(2): p. 177-187.
187. Chopinet, L., et al., *Destabilization induced by electroporation analyzed by atomic force microscopy*. Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes, 2013. **1828**(9): p. 2223-2229.
188. Thompson, G.L., et al., *Disruption of the Actin Cortex Contributes to Susceptibility of Mammalian Cells to Nanosecond Pulsed Electric Fields*. Bioelectromagnetics, 2014. **35**(4): p. 262-272.
189. Rols, M.-P., et al., *Electrochemotherapy of cutaneous metastases in malignant melanoma*. Melanoma research, 2000. **10**(5): p. 468-474.
190. Glass, L.F., et al., *Bleomycin-mediated electrochemotherapy of metastatic melanoma*. Archives of dermatology, 1996. **132**(11): p. 1353-1357.
191. Mir, L.M., et al., *Effective treatment of cutaneous and subcutaneous malignant tumours by electrochemotherapy*. British journal of cancer, 1998. **77**(12): p. 2336.
192. Beebe, S.J., et al., *Nanosecond pulsed electric fields modulate cell function through intracellular signal transduction mechanisms*. Physiological measurement, 2004. **25**(4): p. 1077.